

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



**Studium vlivu kancerogenního benzo[a]pyrenu na  
expresi cytochromů P450 a cytochromu b<sub>5</sub> v orgánech  
laboratorního potkana**

*Study of effect of carcinogenic benzo[a]pyrene on cytochromes P450 and  
cytochrome b<sub>5</sub> expression in organs of the rat*

**Bakalářská práce**

**Tomáš Blecha**

**Vedoucí práce: RNDr. Michaela Moserová, Ph.D.**

**Praha 2015**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Michaely Moserové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

Podpis \_\_\_\_\_

Tomáš Blecha

### **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval své vedoucí bakalářské práce RNDr. Michaele Moserové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## Abstrakt

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou velkou skupinou organických látek, které jsou tvořeny pouze atomy uhlíku a vodíku, dvěma a více kondenzovanými aromatickými jádry. Představují skupinu perzistentních organických polutantů (POPs) přítomných ve všech složkách a oblastech životního prostředí. Typickým zástupcem polycyklických aromatických uhlovodíků je benzo[a]pyren, který je tvořen pěti kondenzovanými aromatickými jádry. Benzo[a]pyren je prokarcinogen s genotoxickými účinky, který je aktivován řadou enzymových systémů, jako jsou cytochromy P450 a epoxidhydrolasa, na reaktivní metabolit BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) a 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP. Tyto reaktivní metabolity interagují s DNA a vytváří kovalentní adukty.

V předkládané bakalářské práci byl studován vliv karcinogenního benzo[a]pyrenu (BaP) na expresi cytochromu P450 (CYP)1A1, 1A2 a cytochromu b<sub>5</sub> v játrech, ledvinách a plicích laboratorního potkana. Byla provedena izolace celkové RNA, která byla převedena do cDNA za účasti náhodných primerů („*random primers*“). Pomocí metody polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) byla kvantifikována relativní exprese genů pro CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b<sub>5</sub> v orgánech potkanů premedikovaných BaP a kontrolních (nepremedikovaných) zvířat vůči referenčnímu genu ( $\beta$ -actin). Bylo zjištěno, že benzo[a]pyren vyvolal signifikantní zvýšení exprese u CYP1A1 a CYP1A2 ve všech výše zmíněných orgánech. U cytochromu b<sub>5</sub> byla hladina mRNA signifikantně zvýšena pouze v plicích, zatímco v játrech ani v ledvinách nebylo zjištěno signifikantní zvýšení.

**Klíčová slova:** benzo[a]pyren, cytochrom P450 1A1/1A2, cytochrom b<sub>5</sub>, mRNA, polycyklické aromatické uhlovodíky, RT-PCR

## Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons are a large group of organic compounds which consist solely of carbon and hydrogen atoms, two or more fused aromatic rings. They represent group of persistent organic pollutants (POPs) present in all components and fields of the environment. Benzo[a]pyrene is characteristic compound of polycyclic aromatic hydrocarbons formed by five fused aromatic rings. Benzo[a]pyrene is procarcinogen with genotoxic effects, which is metabolically activated by variety of enzyme systems such as cytochrome P450 and epoxide hydrolase to reactive metabolite of BaP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) and 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP. These reactive metabolites can form covalent DNA adducts.

In the present work, we studied the influence of carcinogenic benzo[a]pyrene on the expression of cytochrome P450 (CYP) 1A1, 1A2 and cytochrome b<sub>5</sub> in livers, kidneys and lungs of laboratory rats. Total RNA was isolated and afterwards converted into cDNA with the participation of random primers. Using polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) the relatively gene expression of CYP1A1, CYP1A2 and cytochrome b<sub>5</sub> was quantified in the organs of rats treated with BaP and control (untreated) animals to a reference gene ( $\beta$ -actin). It was found that benzo[a]pyrene significantly increases expression of CYP1A1 and CYP1A2 in all above-mentioned organs. The level of cytochrome b<sub>5</sub> mRNA was significantly increased only in the lungs, while its level was unchanged in livers and kidneys.

[In Czech]

**Keywords:** benzo[a]pyrene, cytochrome P450 1A1/1A2, cytochrome b<sub>5</sub>, mRNA, polycyclic aromatic hydrocarbons, RT-PCR

## Obsah

1. Úvod.....	10
1.1 Cytochromy P450.....	11
1.1.1 Klasifikace cytochromů P450 .....	11
1.1.2 Struktura cytochromů P450 .....	12
1.1.3 Reakční cyklus cytochromů P450.....	13
1.2 Cytochromy P450 z rodiny 1 .....	15
1.2.1 Cytochromy P450 podrodiny 1A.....	15
1.2.1.1 Cytochromy P450 1A1 .....	16
1.2.1.2 Cytochromy P450 1A2 .....	16
1.3 Receptor pro aromatické uhlovodíky .....	16
1.3.1 Ligandy receptorů pro aromatické uhlovodíky.....	17
1.3.2 Struktura receptorů pro aromatické uhlovodíky .....	17
1.3.3 Mechanismus aktivace receptorů pro aromatické uhlovodíky .....	18
1.4 Cytochrom b <sub>5</sub> .....	19
1.5 Polycyklické aromatické uhlovodíky .....	21
1.5.1 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků .....	23
1.6 Benzo[a]pyren .....	24
1.6.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů .....	26
2. Cíl práce.....	28
3. Materiál a metody .....	29
3.1 Použité chemikálie .....	29
3.2 Použité přístroje .....	29
3.3 Použité metody.....	30
3.3.1 Premedikace potkanů .....	30

3.3.2	Izolace RNA .....	30
3.3.3	Agarosová elektroforéza .....	32
3.3.4	Stanovení koncentrace a čistoty RNA .....	33
3.3.5	Syntéza cDNA - reverzní transkripce .....	34
3.3.6	Polymerasová řetězová reakce v reálném čase .....	35
3.3.7	Statistické vyhodnocení „Real-time“ polymerasové řetězové reakce .....	38
4.	Výsledky .....	39
4.1	Izolace RNA .....	39
4.2	Kvantifikace získané RNA pomocí reverzní transkripce a „real-time“ PCR ..	40
5.	Diskuze .....	43
6.	Závěr .....	45
7.	Seznam použité literatury .....	46

## Seznam použitých zkratk

AhR	receptor aromatických uhlovodíků („ <i>aryl hydrocarbon receptor</i> “)
AKR	enzym aldoketoreduktasa
Arnt	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků („ <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> “)
A <sub>x</sub>	absorbance při vlnové délce x nm
BaP	benzo[a]pyren
bHLH	doména „ <i>helix-loop-helix</i> “
C <sub>t</sub>	„ <i>cycle threshold</i> “
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom(y) P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DRE	sekvence „ <i>Dioxin Responsive element</i> “
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Hsp90	protein teplotního šoku o molekulové hmotnosti 90 kDa („ <i>heat shock protein</i> “)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („ <i>International Agency for Research on Cancer</i> “)
MFO	mikrosomální monooxygenasový systém („ <i>mixed function oxidases</i> “)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NES	„ <i>nuclear export signal</i> “
NLS	„ <i>nuclear localization signal</i> “
NQO1	NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa



PAS	doména „ <i>Per-Arnt-Sim</i> “
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UGT	UDP-glukoronyltransferasa
UV	ultrafialové záření
w/v	hmotnost/objem
XRE	sekvence („ <i>Xenobiotic Responsive Element</i> “)

# 1. Úvod

S rozvojem nových technologií v oblasti průmyslu a zemědělství se v životním prostředí začalo hromadit velké množství cizorodých látek neboli xenobiotik. Jedná se o sloučeniny, se kterými se organismy dříve nesetkávaly a které mají většinou negativní vliv na zdravotní stav lidského organismu. Nejvíce problematické jsou chemické sloučeniny, které jsou pro organismy potenciálně toxické a dále pak ty, které se v prostředí akumulují a mění stav jednotlivých složek celého ekosystému. Mezi takové látky patří například polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrosloučeniny, aromatické aminy a průmyslová barviva <sup>[1]</sup>.

Xenobiotika se označují za látky, které se v organismu běžně nevyskytují, nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj a neslouží ani jako zdroj energie. V současnosti je lze zahrnout do většiny známých tříd chemických látek. Primárním zdrojem xenobiotik je chemický průmysl, sekundárním zdrojem jsou oblasti lidské činnosti, které využívají produkty zdroje primárního, tedy chemického průmyslu. Riziko poškození organismu je závislé nejen na toxicitě dané látky, ale i na její koncentraci a době působení.

Vstup xenobiotik do živých organismů probíhá v několika fázích. Po vstupu do organismu, látka přechází do krevního řečiště, kde může interagovat s plazmatickými proteiny, které slouží jako jejich transportéry, a teprve poté dochází k jejímu vstupu do jednotlivých tělních buněk. Způsob jakým xenobiotikum do živého organismu vstupuje, závisí na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech a na zdroji, ve kterém se nachází. Hlavními zdroji xenobiotik pro člověka jsou potrava, voda a vzduch. Mezi fyzikálně-chemické vlastnosti, které mají významný vliv na poškození organismu, patří rozpustnost ve vodě a organických rozpouštědlech, těkavost u kapalin a reaktivita. Lipofilní látky mají značně usnadněn vstup do organismu, díky skutečnosti, že epitely obsahují velmi vysoké množství lipidů <sup>[2]</sup>.

Abychom mohli zabránit škodlivým účinkům xenobiotik nebo je postupně vyloučit, je potřeba znát metabolismus jejich působení. Klíčovou roli v těchto mechanismech mají enzymy např. cytochromy P450, které výše uvedené sloučeniny metabolizují.

## 1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (označované CYP) jsou největší rodinou hemových proteinů, které se vyskytují téměř ve všech organismech, od bakterií po člověka. Byly objeveny na konci padesátých let minulého století v jaterních mikrosomech potkana [3]. V buňkách jsou lokalizovány zejména v membránách endoplazmatického retikula a některé také v membránách mitochondrií. V lidském těle se vyskytují především v játrech, ale také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách [4].

Z evolučního hlediska jsou cytochromy P450 považovány za velmi staré hemoproteiny, které jsou dokonce evolučně starší než hemoglobin. Jedná se o enzymy, které se vyvíjely cestou divergentní evoluce. Před více než 1,5 miliardami let se z jediného genu archebakterií vyvinulo velké množství odlišných genů kódujících cytochromy prokaryotních i eukaryotních organismů [4].

Název cytochrom P450 je odvozen od faktu, že redukovaná forma tohoto hemoproteinu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje neobvyklé absorpční maximum při 450 nm a „P“ je označení pro pigment [5].

Cytochromy P450 patří mezi hlavní enzymy metabolizující xenobiotika. Cytochromy P450 jsou v první řadě zodpovědnými za reakce I. fáze biotransformace xenobiotik, vedoucí k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buněk a exkreci z organismu. Katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce vedoucí ke vzniku polárnějších (hydrofilnějších) produktů, které mohou být z organismu vyloučeny přirozenou cestou, a nedochází tak k bioakumulaci xenobiotik [4]. Kromě detoxikace xenobiotik, vykazují cytochromy P450 také důležitou roli v metabolických dějích, při kterých jsou jejich substráty například steroidy, mastné kyseliny, tuky a další sloučeniny [6].

### 1.1.1 Klasifikace cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých izoformách či izoenzýmech. Tyto formy jsou klasifikovány do genetických rodin a podrodin na základě identity v aminokyselinové sekvenci (primární struktury) [4].

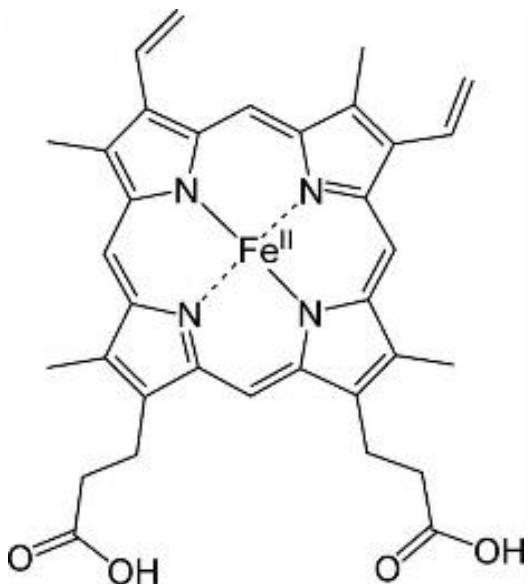
Nové systematické názvosloví genů a forem cytochromů P450 bylo navrženo Nebertem s jeho spolupracovníky [7], formy cytochromů P450 jsou označovány zkratkou

„CYP“ (dle názvu cytochrom P450) následovanou arabskou číslicí označující rodinu (např. CYP1) a velkým písmenem udávající podrodinu (např. CYP1A). Následuje opět arabská číslice (např. CYP1A1) představující konkrétní enzym či gen. Například CYP1A1 náleží do rodiny 1 a patří do její podrodiny A. Pro označení genu se používá kurzíva (*CYP1A1*), aby se dalo rozlišit, zda se jedná o gen či enzym. Cytochromy P450 spadají do stejných rodin, jestliže homologie v aminokyselinové sekvenci je větší než 40 %. Pokud homologie v aminokyselinové sekvenci je větší než 60 %, náleží do jedné podrodiny [8].

V lidském organismu jsou cytochromy P450 rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin [9]. Metabolismu xenobiotik se účastní cytochromy P450 výhradně z tří rodin: CYP1, CYP2, CYP3 a v menší míře CYP4 a ostatní rodiny se podílejí na biosyntéze steroidů, cholesterolu, žlučových kyselin apod [8].

### 1.1.2 Struktura cytochromů P450

Cytochromy P450 spadají mezi hemoproteiny, obsahují ve své struktuře hem *b* (**obrázek 1**), který je tvořen protoporphyrinem IX s centrálním atomem železa vázaného přes čtyři atomy dusíku porfyrinového kruhu [10,11].



**Obrázek 1** Struktura hemu *b* (převzato z [12])

Ve struktuře hemoproteinu je porfyrinový skelet částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, která je přítomna v aktivním centru jako pátý ligand železa. Jako šestý ligand je atom kyslíku molekuly vody. Samotné uspořádání, které umožňuje výjimečné chování a s ním spojené spektrální (absorpční maximum při 450 nm) a katalytické vlastnosti se cytochromy P450 liší od běžných cytochromů. Běžné cytochromy na rozdíl od CYP obsahují jako pátý ligand atom dusíku z imidazolové skupiny histidinu <sup>[1,11]</sup>.

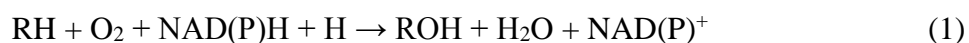
Poškození vazby mezi centrálním atomem železa a thiolátové síry cysteinu dochází ke konverzi cytochromu P450 na inaktivní formu P420 <sup>[13]</sup>.

### 1.1.3 Reakční cyklus cytochromů P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je členem systému mikrosomálních monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO – z anglického „*mixed function oxidates*“) v nichž funguje jako terminální oxidasa <sup>[4]</sup>. Tento systém je lokalizován v membráně hladkého endoplazmatického retikula <sup>[14]</sup>.

Monooxidas jsou děleny do dvou tříd, vnitřních (interní) a vnějších (externí). Cytochromy P450 náleží do třídy vnějších monooxidas. Tento typ enzymu katalyzuje inkorporaci jednoho atomu molekulárního kyslíku do molekuly substrátu při současně redukci druhého atomu kyslíku na vodu. Vnitřní monooxidasy potřebují dva redukční ekvivalenty od substrátu na redukci jednoho atomu molekulárního kyslíku, zatímco vnější monooxidasy využívají externí redukční činidlo (např. NAD(P)H + H<sup>+</sup>) <sup>[5,14]</sup>.

Monooxygenasové reakce katalyzované systémem cytochromů P450 lze vyjádřit sumární rovnicí: <sup>[5]</sup>



(RH = substrát, ROH = hydroxylovaný produkt)

Schéma reakčního cyklu cytochromů P450 sestávajícího pravděpodobně z 8 kroků znázorňuje **obrázek 2** (str. 15) a text vysvětluje jednotlivé kroky <sup>[1,14]</sup>.

1) V klidovém stavu je ion železa hemu hexakoordinován a nachází se ve „ferri“ formě (v oxidačním čísle III) a v nízkospinovém stavu. Šestým ligandem je kyslík z molekuly vody nebo aminokyselinový ligand. Po navázání substrátu na aktivní místo se

ion železa dostává zásluhou vytlačení šestého ligandu do vysokospinového stavu (ion železa pentakoordinován). Zároveň také dochází ke konformační změně v molekule enzymu, která se projeví například změnou spektrálních vlastností.

2) Přijetím elektronu od NADPH: cytochrom P450 reduktasy se ion hemu v oxidačním čísle III („*ferrí*“ forma) redukuje na oxidační číslo II („*ferro*“ forma), přičemž nadále zůstává ve vysokospinovém stavu. Na „*ferro*“ formu se může vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (např. oxid uhelnatý).

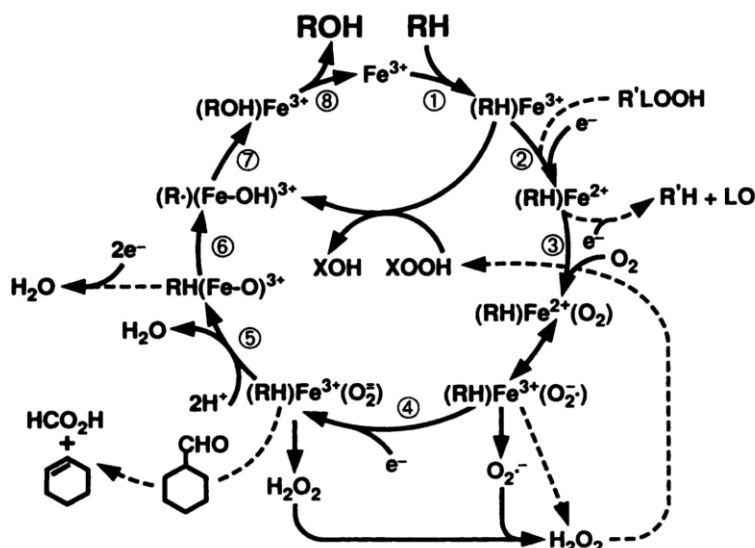
3) Po navázání molekulárního kyslíku vzniká komplex cytochrom P450 - O-O substrát, který následně přechází do jiného mezomerního stavu, na ternární ferri-superoxidový komplex. V tomto komplexu je ion železa opět hexakoordinován, nacházející se v oxidačním čísle III v nízkospinovém stavu.

4) Nepříliš stabilní ferri-superoxidový komplex je podruhé redukován přijetím elektronu z NADPH: cytochrom P450 reduktasy nebo cytochromem b<sub>5</sub> za vzniku ferro-superoxidového komplexu, obsahující vazbu O-O. Jedná se o reakci, která je konečným stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu.

5) U komplexu s biatomickou molekulou kyslíku dochází ke štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku je redukován na vodu přijetím dvou protonů a druhý zůstane vázán na iontu železa v hemu a vzniká tak ferrioxénový komplex.

6) V tomto kroku dochází k odštěpení atomu vodíku z molekuly vhodného substrátu za vzniku substrátového radikálu a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa v hemu.

7,8) Po reakci radikálů vzniká hydroxylovaná molekula substrátu, která je z enzymu uvolněna a nativní forma cytochromu P450.



**Obrázek 2** Schéma reakčního cyklu cytochromů P450 (převzato z <sup>[6]</sup>)

## 1.2 Cytochromy P450 z rodiny 1

Cytochromy P450 z rodiny 1 jsou klíčovými enzymy podílející se na I. fázi biotransformace xenobiotik, především u sloučenin s charakteristickou strukturou, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické nitrosloučenininy a jejich deriváty a také aromatické aminy a amidy. Většina substrátů pro CYP1 jsou planární molekuly složené z minimálně dvou kondenzovaných aromatických nebo heterocyklických kruhů. V těchto substrátech se často vyskytuje dusík jako součást heterocyklu nebo v substituční skupině. Enzymy CYP1 se především účastní detoxikačního metabolismu, avšak díky své biotransformační aktivitě může docházet k metabolické aktivaci mutagenů a karcinogenů <sup>[15]</sup>.

### 1.2.1 Cytochromy P450 podrodiny 1A

Cytochromy P450 podrodiny 1A tvoří dva enzymy CYP1A1 a 1A2 <sup>[16]</sup>. Tyto enzymy jsou nejvýznamnější při aktivaci prokarcinogenů (environmentálních chemikálií, toxických látek a léčiv) a mohou aktivovat až 90 % karcinogenů. Co se týče podobnosti obou enzymů, tak mají velice podobnou strukturu, neboť vykazují 70 % homologii v aminokyselinové sekvenci. Oba enzymy katalyzují stejné nebo podobné reakce, ale liší se zejména v lokalizaci <sup>[4]</sup>.

U rodiny CYP1 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) je indukce exprese genů řízena pomocí Ah receptoru („*Aryl hydrocarbon receptor*“), který váže polycyklické aromatické uhlovodíky <sup>[17]</sup>.

#### 1.2.1.1 Cytochromy P450 1A1

Cytochrom P450 1A1 je extrahepatální monooxidasa, podílejší se na metabolismu endogenních substrátů, léčiv a aktivaci určitých toxinů a environmentálních polutantů. Cytochrom P450 1A1 je jedním z nejvýznamnějších enzymů, biotransformujících prokarcinogeny, tedy polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy a aromatické aminy <sup>[18]</sup>. Nachází se v extrahepatálních tkáních (plíce, kůže, gastrointestinální trakt, placenta a další), kde je však zastoupen ve velmi nízkých konstitutivních koncentracích <sup>[4,19]</sup>. Nicméně tento enzym je velmi inducibilní v mnoha orgánech, především polycyklickými aromatickými uhlovodíky, jako například benzo[a]pyrenem a halogenovanými aromatickými uhlovodíky <sup>[19]</sup>.

#### 1.2.1.2 Cytochromy P450 1A2

Cytochrom P450 1A2 je lokalizován výlučně v játrech (typický hepatální enzym), který má širokou substrátovou specifitu <sup>[4,20]</sup>. Nicméně je také lokalizován v gastrointestinálním traktu, nosním epitelu a mozku <sup>[6]</sup>. Je exprimován v nízkých konstitutivních koncentracích, avšak je inducibilní ve stejných tkáních či orgánech jako CYP1A1 a CYP1B1 <sup>[19]</sup>.

Jedná se o hlavní enzym, který je zapojen do bioaktivace heterocyklických aromatických aminů a metabolismu klinicky významných léčiv, které nejsou substráty CYP1A1 <sup>[19,20]</sup>.

### 1.3 Receptor pro aromatické uhlovodíky

Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR) je nukleární transkripční faktor aktivovaný ligandem, který je zodpovědný za biologické odpovědi vůči toxickým halogenovaným aromatickým sloučeninám, polycyklickým aromatickým uhlovodíkům a dalším sloučeninám <sup>[21]</sup>. AhR je členem rodiny bazických „*helix-loop-helix*“ (bHLH) transkripčních faktorů a je exprimován v mnoha tkáních <sup>[22,23]</sup>.



Hlavní funkcí tohoto receptoru je kontrola exprese genů kódujících enzymy při první fázi biotransformace jako jsou například CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 a také enzymy druhé fáze biotransformace, kterými jsou glutathion-S-transferasy a UDP-glukoronosyltransferasy (UGT) [23].

AhR se vyvinul před 550 miliony let, nicméně první identifikace byla prokázána až v roce 1976 v jaterním cytosolu u myši, při pokusech s 2,3,7,8 -tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD) [22,24].

### 1.3.1 Ligandy receptorů pro aromatické uhlovodíky

Ligandy AhR jsou řazeny do dvou velkých kategorií, a to syntetických ligandů (vytvořené lidskou činností) a ligandů přirozeně se vyskytujících. Tyto ligandy AhR jsou dále rozděleny do dvou podtříd, a to stravovací a endogenní fyziologické ligandy [25].

Jako první byly identifikovány a charakterizovány vysoce afinitní syntetické ligandy AhR, mezi které patří halogenové aromatické uhlovodíky, jako jsou bifenyly, dibenzofurany a polycyklické aromatické uhlovodíky, jako například benzo[a]pyren, benzantracen, a další podobné sloučeniny [26]. Mezi přirozeně se vyskytující ligandy AhR patří sloučeniny, které obsahují indol, jako je například indol 3-karbinol, tetrapyroly, jako je bilirubin a biliverdin, dále produkty, které vznikají UV rozpadem tryptofanu, metabolity mastných kyselin a další látky. Tato skupina endogenních ligandů má nízkou afinitu, jelikož nebyly doposud identifikovány ligandy AhR s vysokou afinitou [23,27].

### 1.3.2 Struktura receptorů pro aromatické uhlovodíky

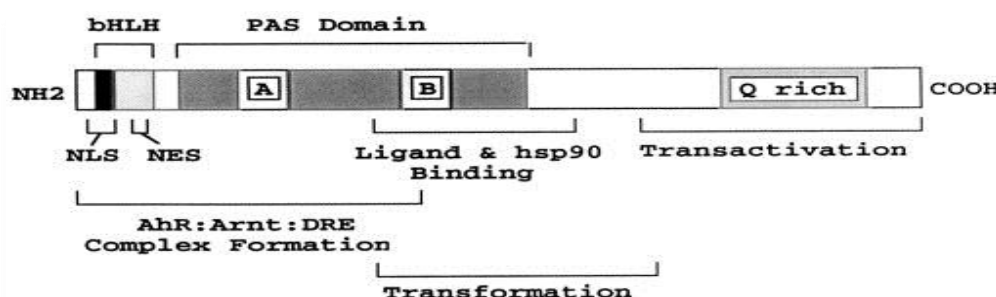
AhR a jeho partner Arnt („*AhR nuclear translocator*“) jsou řazeny do rodiny bazických „*helix-loop-helix Per-Arnt-Sim*“ transkripčních faktorů [28].

Protein obsahuje 3 hlavní funkční domény: (**obrázek 3** str. 18) [29,30,31,32]

*bHLH doména* – je lokalizována na N-terminálním konci proteinu. Je zodpovědná za dimerizaci s jaderným partnerem Arnt, za vazbu k DNA a také za vazbu s proteiny teplotního šoku (Hsp90). Tato doména obsahuje také sekvence NLS („*nuclear localization signal*“) a NES („*nuclear export signal*“). NES sekvence je obsažena kromě domény bHLH také v doméně PAS a společně se sekvencí NLS umožňují vstup AhR do jádra v případě aktivace receptoru.

*PAS doména* – je oblast, která obsahuje 260-310 aminokyselin, nacházející se na C-terminálním konci bHLH domény. Tato doména zodpovídá kromě dimerizace také za vazbu na Hsp90 a vazbu na ligand. Doména je pojmenovaná po třech proteinech, které jej obsahují: Per („*Drosophilla period protein*“), Arnt a Sim („*Drosophilla single-minded protein*“). Je složená ze dvou opakujících se úseků o délce 50 aminokyselin, známých jako PAS A a PAS B, které jsou mezi sebou odděleny úsekem o délce přibližně 150 aminokyselin.

*C-terminální doména* – je zodpovědná za transkripční aktivitu a je lokalizována na C-terminálním konci. Jedná se o oblast, která je bohatá zejména na glutamin („*Q-Rich*“), ale také dále obsahuje prolin, serin, threonin a další sloučeniny, z nichž každá funguje nezávisle a vykazuje různé úrovně aktivity.

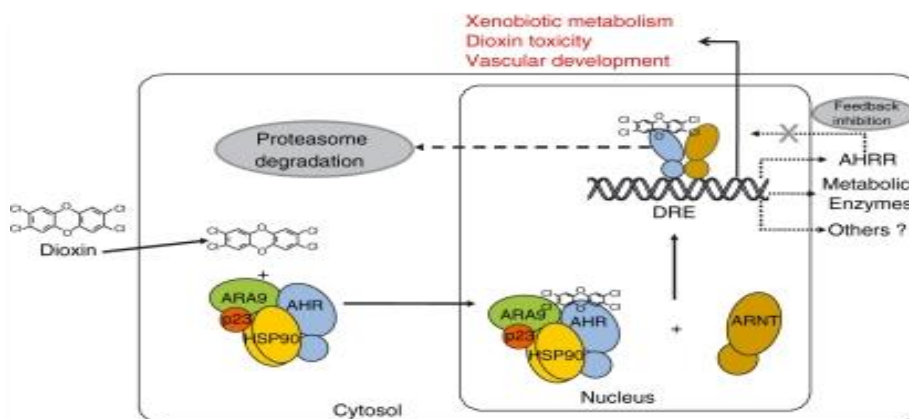


**Obrázek 3** Struktura AhR (převzato z <sup>[25]</sup>)

### 1.3.3 Mechanismus aktivace receptorů pro aromatické uhlovodíky

Neaktivní AhR se nachází v cytoplazmě v podobě multiproteinového komplexu sestávajícího ze dvou proteinů teplotního šoku („*heat shock protein*“ o velikosti 90 kDa) proteiny P23 a proteiny ARA9 (také známé pod označením AIP 1 nebo XAP2) <sup>[33]</sup>. Tento multiproteinový komplex drží AhR ve formě schopného vázat ligand, Hsp90 zabraňuje skryté jaderné translokaci, protein P23 stabilizuje interakci mezi AhR a Hsp90 a protein ARA9 zvyšuje signalizaci AhR. Jak je znázorněno na **obrázku 4** (str. 19), hydrofobní ligand vstupuje do buňky prostřednictvím difuze skrz buněčnou membránu. V cytosolu následně dochází k navázání ligandu na AhR. Poté co se ligand naváže na PAS doménu, způsobí konformační změny, vedoucí k NLS. Tímto způsobem aktivovaný AhR se přemístí do jádra, kde vytvoří heterodimer s Arnt a následně se tento komplex váže s vysokou afinitou na specifická vazebná místa DNA v promotorových oblastech

cílových genů, které se nazývají DRE („dioxin response element“) [34,35]. DRE reguluje genovou expresi a obsahuje nukleotidovou sekvenci 5'-TNGCGTG- 3' [35].

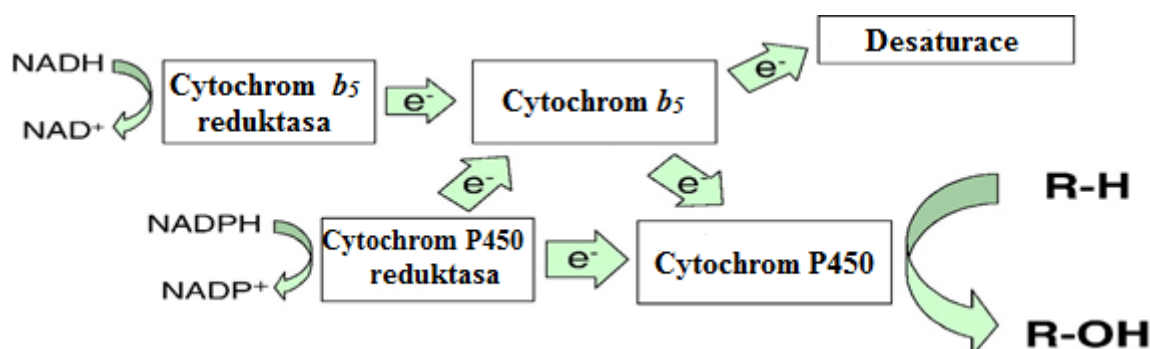


**Obrázek 4** Schéma signální dráhy AhR (převzato z [34])

## 1.4 Cytochrom b<sub>5</sub>

Cytochrom b<sub>5</sub> je malý hemoprotein s molekulovou hmotností 17 kDa, který je schopen přijímat a přenášet elektrony [36]. Původně byl nazýván jako cytochrom „m“, jelikož byl identifikován v mikrozomech [37].

Cytochrom b<sub>5</sub> je membránový protein, který je lokalizován v eukaryotických organismech na vnější straně membrány endoplazmatického retikula a mitochondrií [37,38]. Podílí se na desaturaci mastných kyselin, biosyntéze cholesterolu, plasmalogenů a dalších hydroxylačních reakcích katalyzovaných systémem mikrosomálních monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO). Jak je znázorněno na **obrázku 5** (str. 20), cytochrom b<sub>5</sub> může přijímat elektron z NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy nebo NADPH:cytochrom P450 reduktasy, který následně přenáší na cytochrom P450 [36].



**Obrázek 5** Schematické znázornění přenosu elektronů mezi CYP, cytochromem *b*<sub>5</sub> a jejich reduktasami (převzato z <sup>[39]</sup>)

Cytochrom *b*<sub>5</sub> je malý, cylindrický, kyselé membránový protein, který se skládá z šesti  $\alpha$ -helixů a pěti  $\beta$ -skládaných listů. Dále je tento hemoprotein uspořádaný do dvou domén, větší N-terminální hydrofilní domény, která obsahuje hem a menší C-terminální hydrofobní domény <sup>[37,38]</sup>. Tyto dvě terminální domény jsou spojeny vysoce flexibilním „linkerem“, který je tvořený 15 aminokyselinovými zbytky <sup>[36]</sup>.

Menší hydrofobní doména ukotvuje tento protein k membráně prostřednictvím 14-18 aminokyselin <sup>[38]</sup>. Zatímco větší hydrofilní doména obsahuje stejně jako cytochromy P450 hem typu *b* (protoporfyrin IX). Ten se nachází ve štěrbině hydrofobní kapsy katalytické oblasti, která je tvořena čtyřmi  $\alpha$ -helixy a obsahuje mimo jiné aspartát a glutamát, které jsou vysoce konzervované. Ion železa v hemu je koordinován na rozdíl od CYP dvěma imidazolovými zbytky konzervovaného histidinu <sup>[37]</sup>.

MFO systém může nezávisle obsahovat cytochrom *b*<sub>5</sub> <sup>[37]</sup>. Bylo prokázáno, že cytochrom *b*<sub>5</sub> může jednak stimulovat řadu reakcí katalyzovaných CYP, působit jako inhibitor nebo nemá žádný vliv. Jeho účinek je silně závislý na izoformách CYP, jejich substrátu a reakčních podmínkách. Nicméně mechanismus jeho účinku není doposud přesně znám, ale existuje několik teorií, které se jej snaží objasnit <sup>[36]</sup>:

První teorie předpokládá přímý přenos elektronu z tohoto hemoproteinu na cytochrom P450, což je považováno za krok limitující rychlost monooxygenásové reakce. Právě přenos elektronu je nezbytný jednak pro redukci v monooxygenásovém katalytickém cyklu a k tvorbě aktivovaného molekulárního kyslíku. Cytochromy P450 přijímají elektrony rychleji z NADH:cytochrom *b*<sub>5</sub> reduktasy než z NADPH:cytochrom P450 reduktasy <sup>[36]</sup>. Jestliže druhý elektron není doručen dostatečně rychle, tak se ferri-

superoxidový komplex rozbíjí a uvolněný superoxidový anionradikál je následně enzymem superoxiddismutase přeměněn na peroxid vodíku <sup>[1]</sup>.

Druhá teorie mechanismu účinku předpokládá, že cytochrom  $b_5$  působí jako pozitivní modulátor, který snižuje četnost rozpojení komplexu cytochromu P450 se superoxidovým anionradikálem. Právě úlohou cytochromu  $b_5$  je poskytnout druhý elektron do monooxygenační reakce rychleji, než je rychlost uvolňování superoxidového anionradikálu. Současně dochází k tvorbě aktivovaného molekulárního kyslíku, který následně reaguje se substrátem za vzniku produktu <sup>[37]</sup>.

Třetí teorie zahrnuje tvorbu komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem  $b_5$ . Tento komplex je schopen přijmout dva elektrony z NADPH:cytochrom P450 reduktasy v jediném kroku. Zatímco samotný cytochrom P450 musí podstoupit dvě samostatné interakce s výše uvedenou reduktasou. Výše zmíněný komplex zvyšuje rychlost tvorby aktivovaného kyslíku odstraněním dvojí interakce mezi CYP a NADPH:cytochrom P450 reduktasou <sup>[36,37]</sup>.

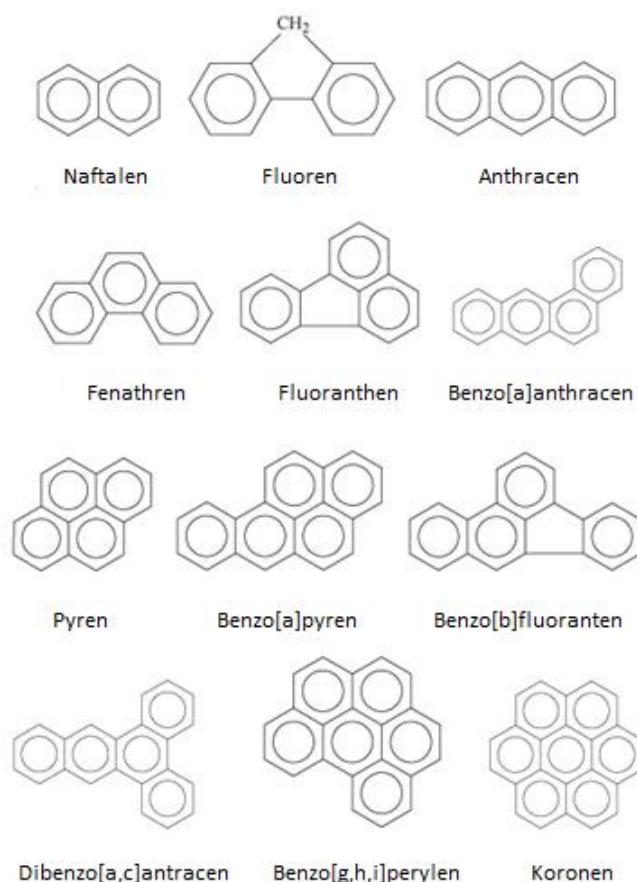
Poslední nejnovější teorie mechanismu účinku předpokládá, že cytochrom  $b_5$  slouží jako efektor bez redoxní role v monooxygenační reakci. Tato efektorová funkce slouží jednak k posílení rozpadu ferrioxenového komplexu a usnadnění toku elektronů přes systém <sup>[37]</sup>.

## 1.5 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou velkou skupinou organických sloučenin, které obsahují ve své struktuře pouze atomy uhlíku a vodíku, a tedy neobsahují žádné heteroatomy ani substituenty. Jedná se především o planární sloučeniny, které obsahují ve své struktuře dva nebo více různě uspořádaných kondenzovaných benzenových kruhů <sup>[40]</sup>. PAU obsahující až šest kondenzovaných benzenových jader, jsou často označovány za „lehké“, zatímco ty, které obsahují více než šest benzenových jader se označují za „těžké“ <sup>[41]</sup>. PAU jsou poměrně snadno metabolizovatelné ve srovnání s polyhalogenovanými aromatickými sloučeninami, nicméně mohou být nalezeny ve vysokých koncentracích ve všech složkách životního prostředí <sup>[42]</sup>.

V čisté formě se PAU vyskytují jako bezbarvé, bílé nebo světle žluté krystalické látky s relativně nízkou rozpustností ve vodě, vysokou teplotou tání a varu a nízkou tenzí

par. Se zvyšující se molekulovou hmotností, jejich rozpustnost ve vodě klesá, teplota varu a tání se zvyšuje a tlak par se snižuje <sup>[43]</sup>. Chemické struktury běžně studovaných PAU jsou uvedeny na **obrázku 6**.



**Obrázek 6** Struktury některých běžně studovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (převzato z <sup>[43]</sup>)

Současně se řadí mezi skupinu perzistentních organických látek přítomných ve všech složkách a oblastech životního prostředí <sup>[44]</sup>. Životní prostředí ovlivňují přírodní a antropogenní zdroje emisí PAU. Mezi přírodní zdroje emisí PAU patří například vulkanická činnost. Zatímco mezi antropogenní zdroje emisí patří vedlejší produkty při spalování fosilních paliv (benzin, petrolej, uhlí, motorová nafta) a organické hmoty za nedokonalého přístupu kyslíku při hoření dřeva, ropy, odpadků ve spalovnách apod. Dále se vyskytují v tabákovém a cigaretovém kouři, při výrobě koksu a také asfaltu. PAU byly také identifikovány při tepelných úpravách potravin, kde byly naměřeny vysoké koncentrace (grilování (300 µg/kg), pražení (130 µg/kg), sušení a uzení)<sup>[43,44,45,46]</sup>. Lze tedy říci, že PAU jsou široce rozšířené environmentální kontaminanty, které mají toxické,

mutagenní a karcinogenní účinky. Vzhledem k jejich všude přítomnému výskytu, bioakumulačnímu potenciálu, biologické aktivitě a trvalému působení je populace vystavena určitému riziku spojenému s karcinogenní a mutagenní aktivitou některých z těchto látek. Na základě rozdílů v biologické aktivitě se jednotlivé PAU od sebe liší, nicméně obecně platí, že všechny PAU, které vykazují karcinogenní aktivitu, jsou mutagenní, přestože ne všechny mutagenní PAU jsou karcinogenní [43,44].

PAU mohou vstupovat do těla živých organismů třemi způsoby, inhalačně, perorálně a transdermálně. Jsou metabolizovány v několika orgánech (játra, plíce, ledviny) a posléze vyloučeny do žluče, moči nebo mateřského mléka a v omezené míře se ukládají do tukové tkáně. Právě lipofilní charakter umožňuje PAU snadno pronikat buněčnými membránami. Tyto látky jsou metabolizovány ve vodě na rozpustnější formy, což usnadňuje jejich vyloučení z organismu. Nicméně, PAU mohou být přeměněny na toxičtější či dokonce karcinogenní metabolity [41].

### 1.5.1 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků

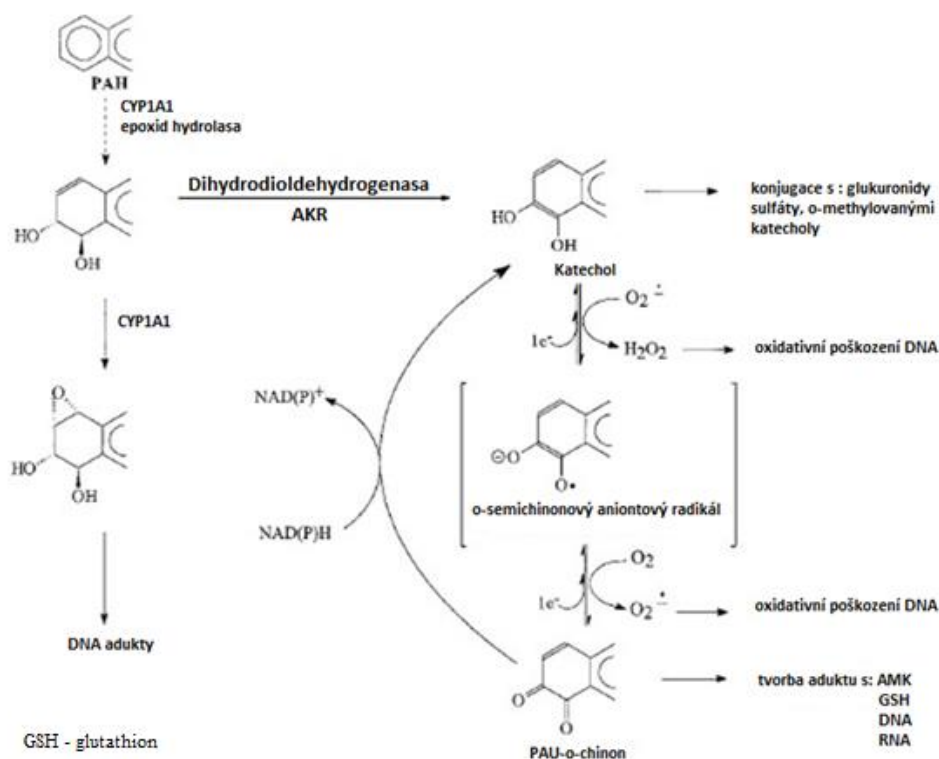
Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou prokarcinogeny, které vyžadují metabolickou aktivaci k uplatnění karcinogenních účinků. Právě prokarcinogenní PAU indukují jejich vlastní metabolismus a aktivaci vazbou na AhR, který je následně translokován do jádra a aktivuje transkripci zejména *CYP1* genů prostřednictvím xenobiotického responsního elementu (XRE).

Hlavní dráha metabolické aktivace PAU probíhá za účasti enzymů CYP a epoxidhydrolas za vzniku PAU-*trans*-dihydrolů. Tyto PAU-*trans*-dihydroly mohou podstoupit další oxidativní metabolismus, vedoucí ke vzniku reaktivních elektrofilů prostřednictvím dvou enzymových drah (**obrázek 7** str. 24) [47].

V první dráze enzymy CYP1A1 katalyzují druhotnou epoxidaci *trans*-dihydrolů za vzniku dihydrodiolepoxidů, které jsou chráněny před epoxidhydrolasou v důsledku sterických zábran v „oblasti zátoky“. Jejich odolnost vůči hydrolýze jim umožňuje vstoupit do jádra, ačkoliv přesný proces vstupu není znám. Diol-epoxidy jsou reaktivní metabolity, které reagují s DNA za vzniku kovalentních aduktů jak *in vivo*, tak *in vitro* [47].

Druhá dráha aktivace PAU je katalyzována aldoketoreduktasami (AKR), což jsou monomerní cytosolové NADP(H) dependentní oxidoreduktasy. Významné isoformy u potkanů (AKR1C9) a člověka (AKR1C1-AKR1C4) katalyzují oxidaci *trans*-dihydrodiolů

na o-chinony <sup>[47,48]</sup>. O-chinony jsou elektrofilní metabolity, které vstupují do redoxních cyklů za vzniku jednoelektronových chinonů a amplifikují výskyt reaktivních forem kyslíku (ROS). Samotné o-chinony mohou tvořit také kovalentní adukty s DNA <sup>[47]</sup>.



**Obrázek 7** Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků (převzato z <sup>[48]</sup>)

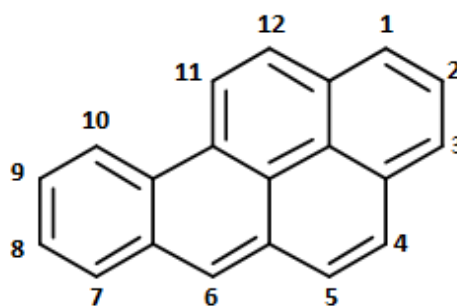
Struktury metabolicky aktivních PAU tvoří tzv. „oblast zátoky“ („*bay region*“) a „oblast fjordu“ („*fjord region*“). Jedná se o strukturální rozdíly v kritické oblasti vzniku epoxidu. Metabolicky aktivované PAU, které obsahují „oblast fjordu“ jsou mnohem reaktivnější, než PAU, které obsahují „oblast zátoky“. Nicméně tyto dvě oblasti jsou zodpovědné za vazbu na nukleofilní části DNA, za vzniku kovalentních aduktů. „Oblast fjordu“ se většinou váže na adenin, zatímco „oblast zátoky“ se váže spíše na guanin <sup>[49,50]</sup>.

## 1.6 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (BaP) označovaný také jako benzo[def]chrysen je organická sloučenina tvořená pěti kondenzovanými aromatickými kruhy (**obrázek 8** str. 25) <sup>[51]</sup>.



Poprvé byl izolován v roce 1933 z černouhelného dehtu. Tento výzkum prokázal, že BaP je ve skutečnosti jedním z karcinogenních PAU v černouhelném dehtu <sup>[53]</sup>. Podle IARC se BaP řadí od roku 2012 mezi karcinogeny 1. třídy <sup>[54]</sup>.



**Obrázek 8** Struktura benzo[a]pyrenu (převzato z <sup>[52]</sup>)

BaP a ostatní PAU jsou široce rozšířené environmentální polutanty vznikající při nedokonalém spalování nebo pyrolýze organických látek. Nachází se v ovzduší, půdě a ve vodě, zpravidla ve stopových koncentracích. Dále jsou přítomny v některých potravinách a několika farmaceutických přípravcích. Těmto organickým sloučeninám, a to ve vysokých koncentracích, jsou vystaveni hlavně pracovníci v oblasti výroby železa, oceli a hliníku <sup>[51,55]</sup>. Konkrétně BaP se vyskytuje především v cigaretovém kouři, kde je označován, za hlavní karcinogen <sup>[56]</sup>. Lze tedy říci, že expozice člověka BaP a ostatních PAU je nevyhnutelná <sup>[57]</sup>.

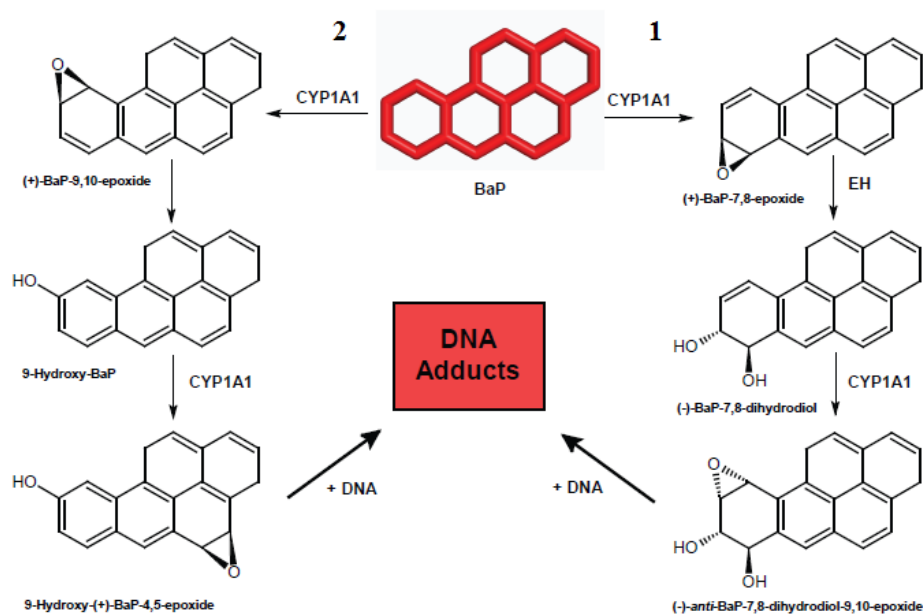
BaP se dostává do organismu, kromě inhalace cigaretového kouře, průmyslových emisí a výfukových plynů, také perorální cestou. Bylo provedeno několik studií k určení hladiny expozice BaP a jiných PAU. Ve většině případů se dospělo k závěru, že hlavním zdrojem expozice BaP pro člověka je strava <sup>[58,59]</sup>. Mezi potravinové zdroje patří tepelně upravené maso, dále obiloviny a zelenina, která roste v kontaminované půdě <sup>[51,57]</sup>.

U BaP bylo prokázáno, že způsobuje cytotoxické, tetragenní, genotoxické, mutagenní a karcinogenní účinky u různých typů tkání a buněk v organismech. U všech testovaných zvířat (potkan, morče, králík, opice), kterým byl BaP různou formou podán (inhalačně, intravenózně, orálně apod.), byl prokázán jeho karcinogenní účinek <sup>[51,60]</sup>. K uplatnění genotoxického účinku BaP, musí být před reakcí s DNA metabolicky aktivován. Tato aktivace probíhá za účasti CYP (především z rodiny 1) a epoxidhydrolasy, za vzniku reaktivního metabolitu BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE). Tento reaktivní metabolit reaguje s DNA a vytváří kovalentní adukty na deoxyguaninu v poloze  $N^2$  v experimentech *in vivo* a *in vitro*. V několika dříve publikovaných studiích bylo zjištěno, že BaP zvyšuje hladinu exprese cytochromu P450 1A1 a 1A2 na úrovni proteinů, především v jaterních mikrosomech laboratorních potkanů <sup>[60,61]</sup>.

### 1.6.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů

Cytochromy P450 jsou s epoxidhydrolasami hlavními enzymy, které aktivují BaP <sup>[60]</sup>, zatímco jeho detoxikace je katalyzována především konjugačními enzymy, jako jsou UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) nebo glutathion-S-transferasy (GST) <sup>[65]</sup>. Metabolické aktivace (*obrázek 9* str. 27) spočívá v oxidaci BaP katalyzované CYP (především CYP1A1 a CYP1B1) za vzniku BaP-7,8-epoxidu. Vzniklý epoxid je následně převeden hydrolytickou reakcí katalyzovanou mikrosomální epoxidhydrolasou na reaktivní metabolit BaP-7,8-dihydrodiol. Posléze je výše uvedený metabolit oxidován prostřednictvím CYP na konečný reaktivní metabolit BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), který je schopen reakce s DNA a tvorby kovalentních aduktů především s purinovými bázemi guaninu, a to 10-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tertrahydro-BaP <sup>[62,63,64]</sup>. Metabolická aktivace BaP při tvorbě druhého aduktu je zprostředkována oxidačními reakcemi, které jsou katalyzovány CYP za vzniku BaP-9,10-epoxidu. Tento vzniklý epoxid je převeden bez účasti enzymu epoxidhydrolasy na 9-hydroxy-BaP. Následně je tento reaktivní metabolit oxidován prostřednictvím CYP1A1 na konečný reaktivní metabolit 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP, který může tvořit adukty s deoxyguanosinem v DNA <sup>[65]</sup>.

Nicméně se zdá, že úloha CYP1A1 v metabolismu BaP je složitější, neboť tento enzym hraje důležitější roli v detoxikaci BaP v játrech potkanů než v aktivaci <sup>[66]</sup>. Za hlavní detoxikační produkt BaP je považován 3-hydroxy-BaP, který je tvořen CYP1A1 <sup>[65]</sup>.



**Obrázek 9** Mechanismus aktivace a tvorba aduktů benzo[*a*]pyrenu s DNA  
(převzato z <sup>[65]</sup>)

Stechiometrie metabolické transformace BaP k diolům a diolepoxidům je důležitou složkou tohoto mechanismu účinku. Díky vytvoření chirálních uhlíků v průběhu metabolických změn, tak mnoho metabolických intermediátů BaP mají několik stechiometrických forem (enantiomerů, diastereoizomerů). Jelikož metabolismus postupuje, tak složitost stereochemických forem se zvyšuje a nakonec vznikají čtyři opticky aktivní izomery BaP-7,8-diol-9,10-epoxidu [ (+) / (-)-anti- a (+) / (-)-syn]. Diolepoxydy reagují s DNA, a to zejména s purinovými bázemi, deoxyguanosinem a deoxyadenosinem, kdy každý produkt může tvořit *cis* a *trans* konformaci. Celkem vzniká 16 BaP-7,8-diol-9,10-epoxid DNA aduktů <sup>[51]</sup>.

## 2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- Izolovat celkovou RNA z vybraných orgánů laboratorních potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných benzo[a]pyrenem
- Převést RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA
- Kvantifikovat pomocí metody „real-time“ PCR původní obsah mRNA CYP1A1, CYP1A2 a cytochromu b<sub>5</sub> v játrech, ledvinách a plicích potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem relativně vůči kontrolnímu genu (β-aktin)
- Porovnat získané výsledky se stanovením relativního množství mRNA pro CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b<sub>5</sub> ve vybraných orgánech potkanů kontrolních (nepremedikovaných)

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Použité chemikálie

Ambion (USA)	Nuclease free H <sub>2</sub> O
Applied Biosystems (USA)	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Gene Ex-pression Master Mix
Bio Basic Inc. (Kanada)	TRIS, kyselina boritá, EDTA
Fermentas (Kanada)	DNA marker ( $\lambda$ DNA EcoRI + Hind III)
Invitrogen (USA)	Trizol <sup>®</sup> Reagent, SYBR Green II
Lach-Ner (ČR)	Isopropanol, Ethanol
Life Technologies (USA)	Taqman Gene Expression Assay $\beta$ -aktin - Rn00667869_m1 CYP1A1 - Rn00487218_m1 CYP1A2 – Rn00561082_m1 Cytochrom b <sub>5</sub> – Rn013997139_m1
Linde (Německo)	Tekutý dusík, suchý led
New England BioLabs (UK)	Gel loading Dye, Blue (6x)
Penta (ČR)	Chloroform

#### 3.2 Použité přístroje

Centrifuga	Centrifuge Eppendorf 5415R
Cykler	Techgene 21
Flow box	Labox (BIO: 126)

Mini centrifuga	Labnet
Real-time cykler	RotorGene2000 – Real-Time Cyclor, Corbett research
Spektrofotometr	Helios $\alpha$
Termoblok	VLMLS1
Transilluminator	DarkReader, transilluminator DR-45M
Vortex	VELP scientifica Rx <sup>3</sup>
Zdroj napětí	Electrophoresis Power Supply-EPS 301

### 3.3 Použité metody

#### 3.3.1 Premedikace potkanů

Laboratorní potkani (samci) z kmene Wistar o hmotnosti 150 - 200 g byli drženi při teplotě  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  a granulovaná strava a voda jim byla podávána *ad libitum*. Premedikace byla zahájena po týdenní aklimatizaci. Potkanům byl jednorázově podán perorálně gaváží do žaludku benzo[a]pyren v dávce 120 mg / kg potkana. Den před usmrcením byla potkanům odebrána strava. Po usmrcení byly potkanům odebrány plíce, játra a ledviny.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č. 419/2012 Sb. v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 2).

#### 3.3.2 Izolace RNA

Izolace vysoce kvalitní a neporušené RNA je velmi náročný proces, který je velmi důležitým výchozím bodem pro mnoho aplikací v molekulární biologii <sup>[67]</sup>. Při izolaci RNA se používají komerční dostupné činidla například TRIzol<sup>®</sup> Reagent, který byl v této

bakalářské práci využít. Purifikace RNA za použití TRIzol<sup>®</sup> je zvláště výhodná v situacích, kdy jsou buňky nebo tkáně obohaceny o endogenní RNasy [68].

TRIzol<sup>®</sup> Reagent je komerční činidlo, které se využívá při izolaci vysoce kvalitní RNA (DNA, ale také i proteinů) z buněčných a tkáňových vzorků lidského, zvířecího, rostlinného nebo bakteriálního původu. Jedná se o monofázový roztok fenolu, guanidin isothiokyanátu a dalších komponent, které usnadňují izolaci různých typů RNA. TRIzol<sup>®</sup> Reagent udržuje integritu RNA v homogenizovaném vzorku v důsledku vysoce účinné inhibice aktivity RNas. Po homogenizaci vzorku s TRIzol<sup>®</sup> Reagent se přidá chloroform. Homogenát je centrifugován a rozdělen na tři fáze, horní čirou (vodnou) vrstvu obsahující RNA, mezifázi a červeně zbarvenou spodní organickou vrstvu obsahující DNA a proteiny. RNA je z vodné vrstvy vysrážena isopropanolem a následně promyta ethanolem k odstranění nečistot [69].

Po celou dobu izolace byly používány rukavice bez pudru a celý postup byl proveden ve flow boxu (LABOX typ: BIO 126). Všechny laboratorní pomůcky určené k izolaci RNA (špachtle, pinzety, třecí misky s tloučky a kádinky) byly sterilizovány spolu s pipetovacími špičkami s filtrem a mikrozkuškami Eppendorf v sušárně při teplotě 130 °C po dobu 6 hodin. Sterilizované pomůcky byly poté vloženy do flow boxu (LABOX typ: BIO 126) společně s očištěnou mikrocentrifugou, polystyrenovou nádobou na tekutý dusík, pipetami se stojanem a stojany na mikrozkušky. Po vložení všech potřebných laboratorních pomůcek byl flow box (LABOX typ: BIO 126) vysvícen 15 - 20 min UV zářením k usmrcení mikroorganismů.

Vzorek každé tkáně byl homogenizován v třecí misce za použití kapalného dusíku. Vzniklý homogenát byl pomocí špachtle rovnoměrně rozdělen do mikrozkušek se 750 µl TRIzol<sup>®</sup> Reagent, přičemž na 1 ml TRIzol<sup>®</sup> připadá 100-150 mg tkáně [69]. Vzorky byly následně promíchány na vortexu (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>) a inkubovány po dobu 5 min při laboratorní teplotě v obrácené poloze (postaveny na víčko). Po inkubační době bylo ke vzorkům přidáno 150 µl chloroformu, přičemž na 1 ml TRIzol<sup>®</sup> je třeba 0,2 ml chloroformu [69]. Každá mikrozkuška se vzorkem byla následně promíchána 15 sec na vortexu (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>) a opět inkubována 3 min při laboratorní teplotě. Po této inkubaci byly vzorky odstředěny v centrifuze (Eppendorf 5415R) při 12 000 × g při 4 °C po dobu 15 min.

Po odstředění byla z každého vzorku velice opatrně, po 80 µl, odebrána horní (vodná) fáze do čistých mikrozkušavek. Ke vzorkům s odebranou vodnou fází bylo přidáno stejné množství isopropanolu a následně byly vzorky promíchány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky opět centrifugovány (Eppendorf 5415R) při  $12\,000 \times g$  při 4 °C po dobu 15 min. Vzniklý supernatant byl slit do kádinky a k vytvořené peletě bylo přidáno 750 µl 75 % ethanolu (v „*RNase free*“ vodě, která neobsahuje nukleasy) a vzorky byly promíchány na vortexu (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>) a následně centrifugovány (Eppendorf 5415R) při  $7\,600 \times g$  při 4 °C po dobu 5 min.

Supernatant byl opatrně odebrán automatickou pipetou a ethanol byl odpařen na termobloku (VLMLS1) po dobu několika minut při 60 °C. Vzorky byly ředěny 40 µl „*RNase free*“ vodou, krátce promíchány na vortexu (Velp scientifica Rx<sup>3</sup>) a inkubovány 15 min při teplotě 60 °C. Po inkubační době byly vzorky rozpipetovány a aliquoty mRNA byly uchovány v mrazicím boxu při teplotě – 80 °C.

### 3.3.3 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza je jednoduchou a vysoce účinnou metodou pro identifikaci a separaci fragmentů RNA (i DNA) o různých velikostech v rozmezí od 10 bp do 25 kb. Během tuhnutí polymery agarosy nekovalentně asociují a vytváří síť svazků. Molekula RNA je díky přítomnosti fosfátového zbytku záporně nabitá, a tudíž v elektrickém poli fragmenty RNA migrují ke kladně nabitě anodě. Protože RNA má uniformní poměr hmotnost/náboj, jsou tyto molekuly rozděleny na základě velikosti v agarosovém gelu takovým způsobem, že vzdálenost jejich pohybu je nepřímo úměrná logaritmu jejich molekulové hmotnosti. Rychlost migrace molekuly RNA je určena velikostí molekuly, koncentrací agarosy, konformací RNA, přiváděným napětím a výběrem pufru pro elektroforézu. Po separaci mohou být molekuly RNA vizualizovány UV zářením za použití vhodného barviva [70].

Odměrné válce a Erlenmayerovy baňky byly před samotným postupem sterilizovány při teplotě 130 °C po dobu 6 hodin.

Byla připravena 1 % (w/v) agarosa ve 40 ml 0,5× TBE (5× koncentrovaný zásobní TBE pufr; 445mM TRIS; 445mM kyselina boritá; 10mM EDTA; pH 8-8,3). Směs byla umístěna do mikrovlnné trouby a zahřívána, dokud nedošlo k dokonalému rozpuštění



agarosy. Po rozpuštění byl gel ochlazen pod proudem tekoucí vody a opatrně nalit do elektroforetické vaničky. Do gelu byl vložen hřeben k vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí byl hřeben odstraněn a vanička se ztuhlým gelem byla umístěna do elektroforetické aparatury, která byla naplněna elektrodoým pufr 0,5x TBE.

Izolované vzorky RNA o objemu 2,5 µl byly doplněny „*RNase free*“ vodou na celkový objem 5 µl a ke každému vzorku byl přidán 1 µl vzorkového pufru "6× *Loading dye*". Marker byl připraven smícháním 1 µl λ EcoRI + HinDIII s 4 µl H<sub>2</sub>O a 1 µl vzorkového pufru „6× *Loading dye*" s následným zahřátím na 65 °C a posléze zchlazení na ledu po dobu 3 min <sup>[71]</sup>. Do vytvořených jamek byly aplikovány vzorky a aparatura byla připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power supply – EPS 301). Elektroforéza probíhala při napětí 110 V po dobu 45 – 50 min.

Po skončení elektroforézy byl gel umístěn do barvicí lázně obsahující 50 ml 1× TBE s 5 µl barvy SyberGreen II a 30 min ponechán na třepačce. Poté byl gel umístěn na transiluminátor (Dark Reader) a v temné místnosti vyfotografován.

### 3.3.4 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace RNA se běžně používá absorpční spektroskopie v UV oblasti při vlnové délce 260 nm. Absorbance RNA se zpravidla koriguje na absorbanci pozadí při 320 nm. Poměr mezi hodnotami absorbance při 260 nm a 280 nm se používá pro posouzení čistoty RNA s ohledem na kontaminanty absorbující v UV např. fenoly a proteiny. Vysoce purifikovanou RNA považujeme, dosahuje-li poměr ( $A_{260} / A_{280}$ ) hodnoty v rozmezí 1,8 – 2,1 <sup>[72]</sup>.

Vzorek izolované RNA o objemu 5 µl byl nejprve doplněn „*RNase free*“ vodou na celkový objem 400 µl a následně bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu 230-330 nm na spektrofotometru (Helios α) za použití křemenné kyvety. Jako referenční vzorek byla použita „*RNase free*“ voda.

Čistota izolované RNA byla zjištěna podle poměru:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}} \quad (2)$$

Koncentrace izolované RNA byla spočtena podle vzorce:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \times 40 \times \text{ředění} \quad (3)$$

( $A_{260} = 1$  odpovídá koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$ )

### 3.3.5 Syntéza cDNA - reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu RNA do cDNA za účasti enzymu retrovirové reversní transkriptasy, které přepisují RNA na cDNA [73]. Reverzní transkriptasy jsou retrovirové DNA polymerasy, které na rozdíl od jiných DNA polymeras, syntetizují DNA, jak z RNA tak DNA. Obecně platí, že všechny retrovirové reverzní transkriptasy postrádají 3'-5' exonukleasovou aktivitu. Z tohoto důvodu je reverzní transkripce vysoce náchylná k chybám [74].

Použitím náhodných hexamerů nebo oligo-dT primerů se maximalizuje počet molekul mRNA, které mohou být analyzovány z malého vzorku RNA. Mezi běžně používané retrovirové reverzní transkriptasy patří například enzymy izolované z viru ptačí myeloblastózy (AMV-RT) nebo z Moloneyova myšího leukemického viru (MMLV-RT) [75]. AMV-RT je robustnější než MMLV-RT [76], zachovává si významnou polymerizační aktivitu až do 55°C a může pomoci eliminovat problémy spojené se sekundární strukturou RNA [77]. Zatímco MMLV-RT má značně nižší RNasovou aktivitu než AMV-RT [78].

Na syntézu cDNA byl použit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* [79].

Po celou dobu práce byly používány rukavice bez pudru a pracovalo se ve flow boxu (LABOX typ: BIO 126). Mikrozskumavky a pipetovací špičky s filtrem byly sterilizovány v sušárně při 130 °C po dobu 6 hodin. Sterilizované pomůcky byly umístěny do flow boxu společně se stojanem na pipety, mikrozskumavkami, kádinkami a mikrocentrifugou. Po vložení všech potřebných pomůcek byl flow box asi na 10 min vysvícen UV zářením.

Do mikrozskumavek bylo pipetováno odpovídající množství RNA vztažené na 1  $\mu\text{g}$  společně s „*RNase free*“ vodou na celkový objem 10  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly promíchány poklepem, krátce centrifugovány na mikrocentrifuze a umístěny na led. Byla také připravena negativní kontrola, která neobsahovala vzorek RNA.

Ke všem vzorkům a také do negativní kontroly bylo pipetováno 9  $\mu$ l roztoku "mixu", který na jeden vzorek obsahoval:

2 $\mu$ l	10 $\times$ RT pufr
0,8 $\mu$ l	25 $\times$ dNTP mix
2 $\mu$ l	10 $\times$ RT Random Primers
1 $\mu$ l	„RNase“ inhibitor
3,2 $\mu$ l	„RNase free“ voda

Po přidání roztoku "mixu" k ředěné RNA, byly vzorky poklepem promíchány a krátce centrifugovány na mikrocentrifuze. Z každého vzorku byly následně odebrány 2  $\mu$ l do čisté mikrozkušavky (kontrola bez reverzní transkriptasy). Do všech vzorků a také do negativní kontroly byl přidán 1  $\mu$ l reverzní transkriptasy. Vzorky byly promíchány, krátce centrifugovány (mikrocentrifuga) a umístěny na led. Následně byly mikrozkušavky se všemi vzorky i kontrolami umístěny do cykleru (Techgene) a nastaveny následující podmínky:

25 °C	10 min (nasednutí „ <i>random primers</i> “)
37 °C	120 min (prodlužování řetězce cDNA)
85 °C	5 min (inaktivace reverzní transkriptasy)

Po ukončení celého cyklu byla získaná cDNA uchována v mrazicím boxu při – 80 °C pro další použití.

### 3.3.6 Polymerasová řetězová reakce v reálném čase

Polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) je jednou z nejčastěji používaných metod, které kvantifikují genovou expresi, jelikož má velký dynamický rozsah, vysokou citlivost a může být vysoce sekvenčně specifická. Jedná se o metodu, která shromažďuje data po celou dobu procesu PCR a kombinuje amplifikaci a detekci v jediném kroku. Toho je dosaženo použitím celé řady různých fluorescenčních chemikálií, které korelují koncentraci s intenzitou fluorescence produktu <sup>[80]</sup>.

Metoda RT-PCR využívá nukleasovou aktivitu 5'-3' DNA polymerasy k rozštěpení TaqMan sondy během PCR a naopak postrádá exonukleasovou aktivitu 3'-5'. TaqMan sonda se skládá z oligonukleotidu, který obsahuje fluorescenční barvivo (zde - FAM<sup>TM</sup>) na 5' konci a zhašecí barvivo (zde - NFQ<sup>TM</sup>) na 3' konci.

Na základě 5'-3' nukleasové aktivity DNA polymerasy dochází ke štěpení sondy na 5' konci pouze v případě, že sonda hybridizuje k DNA nebo RNA ve vzorku. Následně dochází k oddálení sondy od zhasacího barviva, což vede ke zvýšení fluorescence. K tomuto procesu dochází v každém cyklu. Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno v případě, že cílová sekvence je komplementární k sondě [81].

V „real-time“ PCR jsou reakce charakterizovány bodem v čase (nebo v PCR cyklu), kde je cílová amplifikace zjištěna jako první. Tato hodnota se označuje jako práh cyklu („*cycle threshold*“  $C_t$ ), kdy intenzita fluorescence je vyšší než fluorescence pozadí [80].

Dvě nejčastěji používané metody pro analýzu dat z „real-time“ PCR jsou absolutní a relativní kvantifikace. Relativní kvantifikace se používá ke zjištění míry genové exprese. Tato metoda porovnává změnu exprese testovacího genu oproti referenčnímu genu. Referenční geny jsou často označovány jako „*housekeeping genes*“, které jsou přítomny ve všech buňkách, neboť jsou nezbytné pro přežití buněk. Jejich úroveň genové exprese by měla být za všech podmínek stálá a ničím neovlivněna. Relativní kvantifikace nezjišťuje přesnou koncentraci genů, ale zda exprese testovacího genu se zvýšila či snížila.

Pro výpočet relativní kvantifikace lze využít metodu jednak bez korekce efektivity tzv. delta-delta  $C_t$  ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) a s korekcí efektivity. Metoda delta-delta  $C_t$  předpokládá, že účinnost amplifikace cílového a referenčního genu je stejná či velmi podobná [82,83].

V této bakalářské práci byl použit jako referenční gen  $\beta$ -aktin.

Vzorky cDNA bylo třeba naředit 10 $\times$  a kontroly bez reverzní transkriptasy 6 $\times$  do celkového objemu 12  $\mu$ l a poté promíchat a umístit na led. Následně byla připravena směs "mixu", který na jeden vzorek obsahoval:

10 $\mu$ l	„TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Master Mix“
4 $\mu$ l	„RNase free“ voda
1 $\mu$ l	„TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression assay“ ( $\beta$ -aktin resp. CYP1A1, CYP1A2, cytochrom b <sub>5</sub> )

Do sterilních PCR mikrozkušavek bylo přidáno 15  $\mu$ l "mixu" a následně 5  $\mu$ l naředěné cDNA. Pro každý vzorek byla provedena 2 paralelní stanovení. Do referenčního vzorku bylo přidáno 5  $\mu$ l „RNase free“ vody.

Poté byly všechny vzorky umístěny do karuselu přístroje pro „real-time“ PCR (Rotor Gene 2000). Za použití programu Rotor Gene 5 (Rotor-Gene Real-Time Analysis Software, Corbett Research 2000) byly nastaveny následující podmínky:

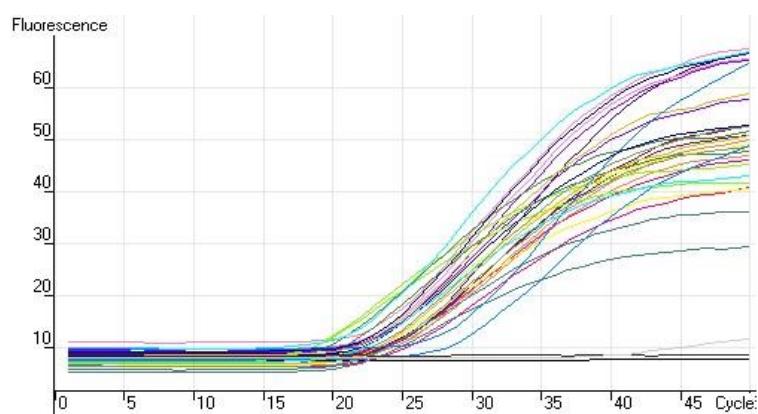
2 min	50 °C (nasednutí primerů)
10 min	95 °C (aktivace DNA polymerasy)

a 50 opakujících cyklů při podmínkách:

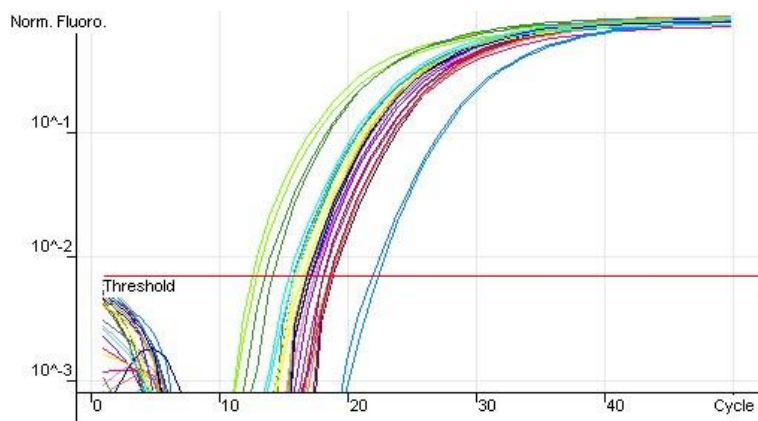
15 sec	95 °C
60 sec	60 °C

Pro vyhodnocení byl použit software Rotor Gene 5 (Rotor-Gene Real-Time Analysis Software, Corbett Research 2000), pomocí kterého byla určena hodnota  $C_t$  (*obrázek 10* str. 38).
















**A)**



**B)**



C)

	blank		Ledviny kontrolní 1
	Játra kontrolní 1		Ledviny kontrolní 2
	Játra kontrolní 2		Ledviny kontrolní 3
	Játra kontrolní 3		Ledviny BaP 1
	Játra BaP 1		Ledviny BaP 2
	Játra BaP 2		Ledviny BaP 3
	Játra BaP 3		Negativní kontrola
	Plíce kontrolní 3		

**Obrázek 10** Amplifikační graf RT - PCR v lineárním (A) a logaritmickém (B) zobrazení s vyznačenou linií „threshold“ spolu legendou křivek (C)

### 3.3.7 Statistické vyhodnocení „Real-time“ polymerasové řetězové reakce

Nejprve byl vypočten aritmetický průměr  $C_t$  (1A1),  $C_t$  (1A2),  $C_t$  (b<sub>5</sub>) a  $C_t$  (β - aktin) dvou paralelních měření určený pro jeden vzorek, který vyjadřuje expresi daného genu v daném vzorku.

Relativní hodnota  $C_t$ , která vyjadřuje expresi sledovaného genu v porovnání s genem referenčním, byla stanovena odečtením hodnot průměru  $C_t$  referenčního genu od hodnot průměru  $C_t$  sledovaného enzymu, dle vzorce:

$$\Delta C_t = C_t(\text{SLED}) - C_t(\text{REF}) \quad (4)$$

Vyjádření míry indukce exprese genů CYP1A1, 1A2 a cytochromu b<sub>5</sub> ve vzorcích tkání odebraných z potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem oproti tkáni potkanů nepremedikovaných byla vypočtena dle vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta\overline{C_t}(\text{BaP}) - (\Delta\overline{C_t}(\text{kontrola})))} \quad (5)$$

Statistické vyhodnocení „real-time“ polymerasové řetězové reakce bylo provedeno pomocí programu REST2009.

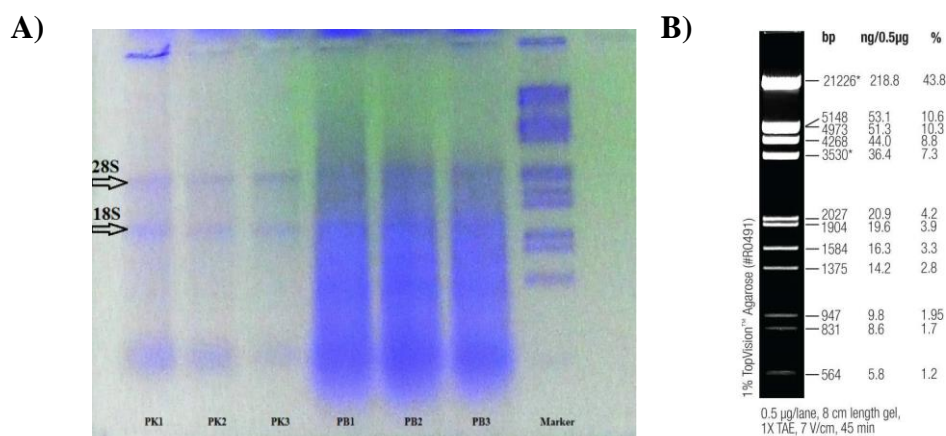
## 4. Výsledky

Pro kvantifikaci mRNA pro enzym CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b<sub>5</sub> byla nejprve provedena izolace celkové RNA z vybraných orgánů laboratorních potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných benzo[a]pyrenem. Izolovaná RNA z potkaních orgánů byla následně převedena pomocí reverzní transkriptasy s použitím náhodných primerů („*random primers*“) na komplementární cDNA. Nakonec byla tato cDNA analyzována pomocí metody „real-time“ PCR s využitím komerčních sond.

### 4.1 Izolace RNA

Izolace celkové RNA z vybraných tkání potkanů premedikovaných BaP byla provedena pomocí komerčního činidla Trizol<sup>®</sup> Reagent. Při izolaci byly vzorky tkání homogenizovány v třecí misce s použitím kapalného dusíku. Integrity a čistota izolované RNA byly zjištěny pomocí horizontální elektroforézy na agarosovém gelu a měřením absorpčních spekter.

Na agarosovém gelu horizontální elektroforézy (**obrázek 11 A**) byly viditelné dva proužky 28S a 18S, což byl důkaz, že nedošlo k degradaci RNA. Pro určení velikosti produktu byl použit DNA marker ( $\lambda$  DNA EcoRI + Hind III)<sup>[71]</sup> (**obrázek 11 B**). Pomocí elektroforézy a porovnání s výše uvedeným markerem byla ověřena kvalita a kvantita produktu.



**Obrázek 11 A** Horizontální agarosová elektroforéza preparátů celkové RNA izolované z plic potkanů premedikovaných BaP (obrázek upraven pomocí programu na <http://apps.pixlr.com/editor/>) **B** DNA marker ( $\lambda$  DNA EcoRI + Hind III) (převzato z <sup>[71]</sup>)

Čistota a koncentrace izolované RNA byly stanoveny spektrofotometricky s použitím vzorců, které jsou uvedeny v kapitole 3.3.4. V absorpčním spektru byl pozorován nárůst absorbance v oblasti 260 nm, zatímco v oblasti 280 nm k nárůstu nedocházelo. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v *tabulce 1*.

**Tabulka 1** Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované RNA

Orgán	Vzorek		Ředění	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	Čistota	CRNA [ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ]
Játra	Kontrolní	JK1	80x	1,045	0,553	0,001	1,89	3,34
		JK2		0,250	0,121	-0,001	2,08	0,80
		JK3		0,396	0,200	-0,002	1,99	1,27
	BaP	JB1	160x	0,561	0,299	0,002	1,88	3,58
		JB2		0,730	0,386	-0,001	1,89	4,68
		JB3		0,810	0,427	0,005	1,91	5,15
Ledviny	Kontrolní	LK1	80x	0,819	0,428	-0,001	1,91	2,62
		LK2		1,016	0,585	-0,001	1,74	3,25
		LK3		0,750	0,385	0,000	1,95	2,40
	BaP	LB1		1,084	0,555	0,000	1,95	3,47
		LB2		0,867	0,442	0,001	1,96	2,77
		LB3		0,815	0,423	-0,001	1,92	2,61
Plíce	Kontrolní	PK1		0,248	0,226	0,002	1,10	0,79
		PK2		0,078	0,030	-0,005	2,37	0,27
		PK3		0,074	0,029	-0,005	2,32	0,25
	BaP	PB1		0,225	0,111	-0,001	2,02	0,72
		PB2		0,094	0,044	-0,004	2,04	0,31
		PB3		0,149	0,076	0,01	2,11	0,44

## 4.2 Kvantifikace získané RNA pomocí reverzní transkripce a „real-time“ PCR

Pomocí reverzní transkripce byla připravena cDNA z 1  $\mu\text{g}$  RNA všech získaných izolovaných vzorků (viz kapitola 3.3.5) za použití komerčního kitu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*.

Metodou „real-time“ PCR byly nejdříve analyzovány všechny vzorky ledvin, jater a plic z hlediska exprese  $\beta$ -aktinu, jakožto referenčního genu, který by měl být ve všech tkáních exprimován ve stejném množství. Následně byla provedena analýza vzorků z hlediska exprese sledovaných genů, tedy *CYP1A1*, *CYP1A2* a *cytochromu b<sub>5</sub>*. Vzorky cDNA jater, ledvin a plic byly ředěny 10x, nicméně po prvních měřeních byly zjištěny příliš nízké hodnoty  $C_t$  plicních vzorků, a proto byla tato cDNA v následujícím kroku



ředěna pouze 5x. Naměřené hodnoty a jejich další zpracování je uvedeno v **tabulce 2, 3** a výsledná míra indukce je uvedena v **tabulce 4** (str. 42). Expresce CYP1A1 byla signifikantně zvýšena v ledvinách (107x), plicích (963x) a játrech (22 914x) oproti kontrole. Signifikantní zvýšení hladiny mRNA pro CYP1A2 bylo v ledvinách (9x), játrech (20x) a v plicích (205x). Zatímco exprese cytochromu *b5* byla signifikantně zvýšena pouze v plicích (32x), kdežto v játrech a ledvinách nebyl zaznamenán signifikantní nárůst exprese.

**Tabulka 2** Určení míry exprese genů pro CYP1A1, CYP1A2, cytochrom *b5* a referenčního genu ( $\beta$ -aktin) ve vzorcích tkání potkanů vyjádřené jako průměr  $C_t$

Orgán	Vzorek		$C_t(\beta\text{-actin})$	$C_t(\beta\text{-actin})$ 5x řaděný	$C_t(1A1)$	$C_t(1A2)$	$C_t(b_5)$
Játra	Kontrolní	JK1	19,00		32,33	20,27	18,68
		JK2	17,54		30,75	17,97	17,18
		JK3	17,51		31,01	18,06	17,44
	BaP	JB1	18,51		17,19	14,69	16,94
		JB2	18,81		17,27	14,84	17,32
		JB3	18,45		17,66	15,03	18,80
Ledviny	Kontrolní	LK1	20,19		29,44	32,58	18,20
		LK2	16,69		26,175	29,45	18,58
		LK3	21,58		25,75	31,09	16,54
	BaP	LB1	21,10		23,16	30,52	17,63
		LB2	23,66		22,01	30,35	18,32
		LB3	21,73		23,98	30,59	18,17
Plíce	Kontrolní	PK1	24,26	18,02	37,83	36,27	22,99
		PK2	18,23	16,48	31,59	35,19	23,04
		PK3	17,27	16,01	29,29	34,74	21,11
	BaP	PB1	19,36	18,41	22,18	28,98	19,30
		PB2	17,67	18,79	19,87	29,84	18,72
		PB3	17,87	17,38	21,80	28,83	18,52

**Tabulka 3** Určení míry exprese CYP1A1, CYP1A2 a cytochromu *b5* v porovnání s referenčním genem vyjádřené jako  $\Delta C_t$

Orgán	Vzorek		$\Delta C_t(\text{CYP1A1})$	$\Delta C_t(\text{CYP1A2})$	$\Delta C_t(\text{cyt } b_5)$
Játra	Kontrolní	JK1	13,33	1,27	-0,32
		JK2	13,21	0,43	-0,36
		JK3	13,50	0,54	-0,07
	BaP	JB1	-1,32	-3,82	-1,58
		JB2	-1,54	-3,98	-1,50

		JB3	-0,79	-3,42	0,35
<b>Ledviny</b>	Kontrolní	LK1	9,25	12,39	-2,00
		LK2	9,49	12,76	1,89
		LK3	4,17	9,51	-5,04
	BaP	LB1	2,06	9,42	-3,47
		LB2	-1,66	6,69	-5,35
		LB3	2,25	8,86	-3,56
<b>Plíce</b>	Kontrolní	PK1	13,57	18,26	4,97
		PK2	13,36	18,71	6,56
		PK3	12,02	18,73	5,10
	BaP	PB1	2,82	10,57	0,89
		PB2	2,20	11,05	-0,07
		PB3	3,93	11,45	1,14

**Tabulka 4** Indukce exprese genů pro CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b<sub>5</sub> v orgánech potkanů premedikovaných BaP v porovnání s potkany nepremedikovanými

Enzym	Orgán	$\Delta\bar{C}_t^{(\beta-actin)} + SD$	$\Delta\bar{C}_t^{(BaP)} + SD$	Míra indukce $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Statistická významnost
<b>CYP1A1</b>	Játra	13,35 ± 0,51	-1,22 ± 0,59	22914,93	P < 0,005***
	Ledviny	7,64 ± 2,78	0,88 ± 2,04	107,51	P < 0,005***
	Plíce	12,98 ± 0,82	2,98 ± 1,02	963,41	P < 0,05*
<b>CYP1A2</b>	Játra	0,75 ± 0,37	-3,74 ± 0,37	20,66	P < 0,005***
	Ledviny	11,55 ± 1,70	8,32 ± 1,38	9,39	P < 0,005***
	Plíce	18,57 ± 0,60	11,02 ± 0,46	205,43	P < 0,05*
<b>Cytochrom b<sub>5</sub></b>	Játra	-0,25 ± 0,28	-0,91 ± 0,98	1,65	Nesignifikantní
	Ledviny	-1,72 ± 3,17	-4,13 ± 1,04	5,31	Nesignifikantní
	Plíce	5,54 ± 0,82	0,65 ± 0,58	32,35	P < 0,05*

(Poz: Hodnota  $\Delta C_t$  uvedená v tabulce představuje průměr 3 vzorků a SD představuje směrodatnou odchylku. Pro statistické zhodnocení byl použit Studentův t-test.)

## 5. Diskuze

Předkládaná bakalářská práce navazuje na dosavadní studie týkající se polycyklického aromatického uhlovodíku benzo[a]pyrenu a jeho vlivu na cytochromy P450, které vznikly v laboratořích katedry biochemie PřF UK v minulých letech. Cílem této bakalářské práce je doplnit dříve získané výsledky exprese cytochromu P450 1A1, 1A2 a cytochromu b<sub>5</sub> v orgánech laboratorního potkana premedikovaného BaP.

V naší laboratoři byla dosud u všech tří výše uvedených složek mikrosomálního systému studována exprese pouze na úrovni proteinů a příslušné enzymové aktivity. Pomocí imunochemické detekční metody *Western blotting*, při které byly použity slepičí a králičí protilátky, bylo zjištěno, že v jaterních mikrosomech dochází vlivem BaP k velkému nárůstu exprese CYP1A1, CYP1A2 a cytochromu b<sub>5</sub> <sup>[84]</sup>. Vzhledem k tomu, že benzo[a]pyren patří mezi charakteristické ligandy Ah receptoru, jehož prostřednictvím jsou indukovány právě cytochromy P450 podrodiny 1A <sup>[65]</sup>, bylo zvýšení exprese sledovaných proteinů velmi pravděpodobné. U cytochromu b<sub>5</sub> stále není přesně znám mechanismus jeho indukce, a tudíž změna exprese byla o to sledovanější.

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv karcinogenního BaP na expresi cytochromů P450 1A1, 1A2 a cytochromu b<sub>5</sub> na úrovni mRNA v játrech, ledvinách a plicích potkana, v orgánech důležitých pro metabolismus xenobiotik. Laboratorním potkanům z kmene Wistar byl jednorázově perorálně gaváží do žaludku podán BaP v dávce 120 mg/kg živé hmotnosti potkana. Cílem této práce, bylo kvantifikovat relativní zastoupení mRNA pro CYP1A1, 1A2 a cytochrom b<sub>5</sub> ve výše uvedených orgánech metodou RT-PCR. Kvantifikace mRNA potvrdila indukci CYP1A1 a CYP1A2 ve všech sledovaných orgánech. Bylo zjištěno signifikantní, řádově stonásobné zvýšení exprese CYP1A1 v ledvinách, tisícinásobné v plicích a až deset tisíckrát vyšší exprese byla zaznamenána v játrech premedikovaných potkanů. V případě CYP1A2 byl zjištěn signifikantní, přibližně desetinásobný, nárůst exprese v játrech i ledvinách premedikovaných zvířat vůči kontrole. V plicích byl nárůst exprese CYP1A2 dokonce stonásobný. Signifikantní zvýšení hladiny mRNA pro cytochrom b<sub>5</sub> bylo pozorováno pouze v plicích premedikovaných zvířat, zatímco v játrech a ledvinách byla exprese daného proteinu téměř beze změny.

Z výsledků je patrné, že míra indukce CYP1A1 vlivem BaP je v játrech mnohonásobně vyšší než v případě CYP1A2. Tento velký nárůst exprese lze vysvětlit tím, že CYP1A1 je především extrahepatálním enzymem a v játrech je konstitutivně zastoupen ve velmi nízké koncentraci  $<1\%$  <sup>[85]</sup> a vlivem BaP dochází k velkému nárůstu jeho hladiny, což je následně zaznamenáno metodou RT-PCR jako obrovský rozdíl mezi hodnotami „*threshold cycle*“ získaných ze vzorků jater potkanů vystavených BaP a kontrolních zvířat (viz **Tabulka 3**). V případě CYP1A2, který je typickým jaterním enzymem, kde je jeho konstitutivní zastoupení více než  $10\%$  <sup>[86]</sup>, nedochází k tak vysokým změnám jako u CYP1A1.

CYP1A1 nehraje důležitou roli pouze v aktivaci BaP na reaktivní metabolity schopné vytvářet kovalentní adukty s DNA <sup>[66]</sup>, ale současné studie ukazují, že při použití potkanů s deletovaným genem pro *CYP1A1* dochází vlivem BaP ke zvýšené tvorbě aduktů BaP s DNA oproti kontrolním potkanům, což naznačuje, že *in vivo* CYP1A1 hraje především roli v detoxikaci BaP a chrání tak organismus před jeho toxicitou <sup>[66,87]</sup>.

## 6. Závěr

V rámci této předkládané bakalářské práce byla úspěšně izolována celková RNA z vybraných orgánů laboratorních potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných benzo[a]pyrenem. Za pomoci reverzní transkripce byla izolovaná RNA převedena do cDNA za účasti náhodných primerů („*random primers*“). Pomocí metody RT-PCR bylo kvantifikováno relativní zastoupení mRNA pro enzymy CYP1A1, CYP1A2 a cytochrom b<sub>5</sub> v orgánech premedikovaných potkanů vůči referenčnímu genu s konstantní expresí (β-actin). Na základě porovnání výsledků získaných pro premedikované a nepremedikované potkany bylo zjištěno, že benzo[a]pyren vyvolal indukci exprese CYP1A1, CYP1A2 ve všech testovacích orgánech, tedy játrech, ledvinách a plicích. Benzo[a]pyren vyvolal indukci exprese cytochromu b<sub>5</sub> pouze v plicích, zatímco v játrech a ledvinách nebyl zaznamenán signifikantní nárůst.

## 7. Seznam použité literatury

- [1] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. (Jr), Martínek, V., Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy*. 98, 876–890.
- [2] Knejzlík, Z., Káš J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chem. listy* 94, 913-918.
- [3] Fatma, M. A. El-garj, Mustafa, F. F. Wajidi.(2013) The Cytochrome P450s, *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 21, 37-41.
- [4] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem. Listy*. 93, 229-237.
- [5] Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 128-145.
- [6] Coon, M. J., Ding, X., Pernecky, S. J., Vaz, A. D.N. (1992): Cytochrome P450: progress and predictions, *FASEB. J.* 6, 669-673.
- [7] Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6, 1-42.
- [8] Stiborová M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Sborník multioborového semináře „Otevřená věda“* z 22. – 29. 10. 2005, Praha
- [9] Nelson, D. R.: Cytochrome P450s in humans  
Dostupné na: <http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf> [cit: 20. 3. 2015]
- [10] Oprea, T. I., Hummer, G., García, A. E. (1997) Identification of a functional water channel in cytochrome P450 enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 2133–2138.
- [11] Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, Ch., Falck, R. J., Farrell, G., Kaminsky, S. L., Spivack, D. S., Boitier, E., Beaune, P. (1999) Human cytochromes P450. *Mol. Aspects. Med.* 20, 1–137.

- [12] <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---H/Heme-B.htm> [cit. 6. 4. 2015]
- [13] Omura, T. (2011) Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 87, 617–640.
- [14] Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy.* 95, 212–22.
- [15] Lewis, D. F., Lake, B. G., George, S. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., Beresford, A. P., Goldfarb, P. S., Guengerich, F. P. (1999) Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102, *Toxicology.* 139, 53-79.
- [16] Bibi, Z. (2014) Retracted: Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism.*
- [17] Goldstone, J. V., Jönsson, M. E., Behrendt, L., Woodin, B. R., Jenny, M. J., Nelson, D. R., Stegeman, J. J. (2009) Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD. *Arch. Biochem. Biophys.* 482, 7-16.
- [18] Walsh, A. A., Szklarz, G. D., Scott, E. E. (2013) Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J. Biol. Chem.* 288, 23847–23850.
- [19] Pávek, P., Dvořák, Z. (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.* 9, 129-143.
- [20] Lim, Y. R., Kim, I. H., Han, S., Park, H. G., Ko, M. J., Chun, Y. J., Yun, C. H., Kim, D. (2015) Functional Significance of Cytochrome P450 1A2 Allelic Variants, P450 1A2\*8, \*15, and \*16 (R456H, P42R, and R377Q). *Biomol. Ther.* 23, 189-194.
- [21] Safe, S. (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 120, 1-7.

- [22] Oesch – Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E., Oesch, F. (2005) Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 9218-9223.
- [23] Mitchell, K.A., Elferink, C. J. (2009) Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity. *Biochem Pharmacol.* 77, 947-956.
- [24] Poland, A., Glover, E., Kende, A. S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 251, 4936-4946.
- [25] Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., Bonati, L. (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141, 3–24.
- [26] Denison, M. S., Nagy, S. R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334.
- [27] Ramadoss, P., Marcus, C., Perdew, G. H. (2005) Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 1, 9-21.
- [28] Wu, D., Potluri, N., Kim, Y., Rastinejad, F. (2013) Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4346-4356.
- [29] Bisson, W., Koch D., O'Donnell, E., Khalil, M. S., Kerkvliet, N., Tanguay, R., Abagyan, R., Kolluri, K. S. (2009) Modeling of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) ligand binding domain and its utility in virtual ligand screening to predict new AhR ligands. *J. Med. Chem.* 52, 5635-5641.
- [30] Jones, S. (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* 5, 226.
- [31] Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29270-29278.



- [32] Flaveny, C., Reen, R. K., Kusnadi, A., Perdew, G. H. (2008) The mouse and human Ah receptor differ in recognition of LXXLL motifs. *Arch Biochem Biophys.* 471, 215-223.
- [33] Dunham, E. E., Stevens, E. A., Glover, E., Bradfield, C. A. (2006) The aryl hydrocarbon receptor signaling pathway is modified through interactions with a Kelch protein. *Mol. Pharmacol.* 70, 8-15.
- [34] Stevens, E. A., Mezrich, J. D., Bradfield, C. A. (2009) The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology.* 127, 299-311.
- [35] Li, S., Pei, X., Zhang, W., Xie, H. Q., Zhao, B. (2014) Functional Analysis of the Dioxin Response Elements (DREs) of the Murine CYP1A1 Gene Promoter: Beyond the Core DRE Sequence. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 6475-6487.
- [36] Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M. (2009) Preparation of a biologically active apo-cytochrome b<sub>5</sub> via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 66, 203-209.
- [37] Schenkman, J. B., Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b<sub>5</sub>. *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152.
- [38] Vergères, G., Waskell, L. (1995) Cytochrome b<sub>5</sub>, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie.* 77, 604-620.
- [39] Dürr, U. H., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b<sub>5</sub> and their reductases--promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768, 3235-3259.
- [40] IARC (2010): Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures. Vol. 92: 33-94.
- [41] <http://www.intechopen.com/books/selected-topics-in-dna-repair/dna-damage-caused-by-polycyclic-aromatic-hydrocarbons-mechanisms-and-markers> [cit. 6. 4. 2015]
- [42] Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganek, M., Neca, J. V. (2001) Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res.* 497, 49-62.

- [43] Haritash, A. K., Kaushik, C. P. (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1-15.
- [44] Tomaniová, M., Kocourek, V., Hajšlová, J. (1997) Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chem. Listy.* 91, 357-366.
- [45] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects" (2002) ([http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf)). European Commission, Scientific Committee on Food. [cit. 7. 4. 2014].
- [46] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (1996) <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=121&tid=25> Agency for Toxic Substances and Disease Registry. [cit 8. 4. 2014].
- [47] Burczynski, M. E., Penning, T. M. (2000) Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer. Res.* 60, 908-915.
- [48] Burczynski, M. E., Lin, H. K., Penning, T. M. (1999) Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer. Res.* 59, 607-614.
- [49] Buterin, T., Hess, M. T., Luneva, N., Geacintov, N. E., Amin, S., Kroth, H., Seidel, A., Naegeli, H. (2000) Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer. Res.* 60, 1849-1856.
- [50] Geacintov, N. E., Cosman, M., Hingerty, B. E., Amin, S., Broyde, S., Patel, D. J. (1997) NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 111-146.
- [51] IARC: Benzo[a]pyrene. *IARC Monogr.* Vol 100 F:111-137.
- [52] <http://www.lookchem.com/Benzo-a-pyrene/> [cit. 9. 4. 2015]
- [53] Boysen, G., Hecht, S. S. (2003) Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat. Res.* 543, 17-30.

- [54] IARC: Dostupné na:  
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> [cit. 8. 4. 2015]
- [55] IARC: (1984) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans Polynuclear aromatic compounds. Part 3. Industrial exposures in aluminum production, coal gasification, coke production, and iron and steel founding. 34, 65–131.
- [56] Alam, S., Conway. M. J., Chen, H. S., Meyers, C. (2008) The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J. Virol.* 82, 1053-1058.
- [57] Phillips, D. H. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443, 139-147.
- [58] Dennis, M. J., Massey, R. C., McWeeny, D. J., Knowles, M. E., Watson, D. (1983) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *Food Chem. Toxicol.* 5, 569-574.
- [59] de Vos, R. H., van Dokkum, W., Schouten, A., de Jong-Berkhout, P. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol.* 4, 263-268.
- [60] Moserová, M., Kotrbová, V., Aimová, D., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M. (2009) Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 239–244.
- [61] Aimová, D., Poljaková, J., Kotrbová, V., Moserová, M., Frei, E., Arlt, V. M., Stiborová, M. (2008) Ellipticine and benzo[a]pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Interdiscip. Toxicol.* 1, 160-168.
- [62] Xue, W., Warshawsky, D. (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73-79.

- [63] Kim, J. H., Stansbury, K. H., Walker, N. J., Trush, M. A., Strickland, P. T., Sutter, T.R. (1998) Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*.19, 1847-1853.
- [64] Arlt, V. M., Stiborová, M., Henderson, C. J., Thiemann, M., Frei, E., Aimová, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Schmitz, O. J., Farmer, P. B., Wolf, C. R., Phillips, D. H.(2008) Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*. 29, 656-665.
- [65] Hodek, P., Fousova, P., Brabencova, E., Moserova, M., Pavek, P., Anzenbacherova, E., Brotanek, J., Hudecek, J., Frei, E., Stiborova, M. (2014) Effect of dihydromyricetin on benzo[a]pyrene activation in rats. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 35, 158-168.
- [66] Uno, S., Dalton, T. P., Derkenne, S., Curran, C. P., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Nebert, D. W. (2004) Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* 5, 1225-1237.
- [67] Griffin, M., Abu-El-Haija, M., Abu-El-Haija, M., Rokhlina, T., Uc, A. (2012) Simplified and versatile method for isolation of high-quality RNA from pancreas. *BioTechniques* 52, 332-334.
- [68] Rio, D. C., Ares, M. Jr., Hannon, G. J., Nilsen, T. W. (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold. Spring. Harb. Protoc.* 6.
- [69] TRIzol Reagent Protocol, dostupné na:  
[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf) [cit. 15. 1.2015]
- [70] Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments., *J. Vis. Exp.* 62.
- [71] Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker dostupné na:  
[http://www.biomart.cn/upload/asset/attachment/fermentas%E4%B8%AD%E5%9B%B D/coa\\_sm0192.pdf](http://www.biomart.cn/upload/asset/attachment/fermentas%E4%B8%AD%E5%9B%B D/coa_sm0192.pdf)
- [72] <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html> [cit. 11. 2. 2015]

- [73] Herschhorn, A., Hizi, A. (2010) Retroviral reverse transcriptases. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2717-2747
- [74] Malboeuf, C. M., Isaacs, S. J., Tran, N. H., Kim, B. (2001) Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. *BioTechniques*. 30, 1074-1078.
- [75] Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- [76] Brooks, E. M., Sheflin, L. G., Spaulding, S. W. (1995) Secondary structure in the 3' UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR. *BioTechniques*. 19, 806-815.
- [77] Freeman, W. M., Vrana, S. L., Vrana, K. E. (1996) Use of elevated reverse transcription reaction temperatures in RT-PCR. *BioTechniques*. 20, 782-783.
- [78] Gerard, G. F., Fox, D. K., Nathan, M., D'Alessio, J. M. (1997) Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol. Biotechnol.* 8, 61-77.
- [79] High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit dostupné na:  
[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4375222\\_HighCap\\_cDNA\\_ReverseTranscriptKits\\_PL.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4375222_HighCap_cDNA_ReverseTranscriptKits_PL.pdf)
- [80] Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 39, 75-85.
- [81] TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix Protocol, dostupné na:  
[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_039284.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf) [cit. 12. 3. 2015]
- [82] Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 29.
- [83] Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402-408.

- [84] Moserová, M. (2011) Metabolismus karcinogenů a léčiv monooxygenasovým systémem, Disertační práce, PřF UK.
- [85] Guengerich F. P., v knize: Cytochrome P450 - Structure, Mechanism and Biochemistry (Ortiz de Montellano P. R., ed.), 2 vyd., str. 473. Plenum Press, New York 1995.
- [86] Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* 10, 667-715.
- [87] Uno, S., Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, C. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Gonzalez, F. J., Nebert, D. W. (2006) Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol. Pharmacol.* 4, 1103-1114.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka